



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DEL  
PROCESO DE ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE  
ESPECIES FORESTALES: CASTAÑO Y CHOPO**

DEPARTAMENTO FISIOLÓGÍA VEGETAL  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
PROGRAMA DE DOCTORADO DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

ELENA VARAS GARCÍA  
SANTIAGO DE COMPOSTELA, 2016



## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR Y TUTOR DE LA TESIS

Dña. María Concepción Sánchez Fernández Científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

D. Ignacio Zarra Cameselle Profesor del Departamento Fisiología Vegetal, Catedrático de la Universidad de Santiago de Compostela.

Como Directora y tutor respectivamente da Tesis de Doctorado titulada:

**« Análisis fisiológico y molecular del proceso de enraizamiento *in vitro* de especies forestales: castaño y chopo »**

Presentada por Dña. Elena Varas García.

Alumna del Programa de Doctorado Ingeniería Biotecnológica

*Autoriza la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directora de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.*

Dra. María Concepción Sánchez Fernández  
(Directora).

Dr. Ignacio Zarra Cameselle  
(Tutor USC)

Elena varas García  
(Doctoranda)






Esta tesis ha sido financiada por:

- El ministerio de Ciencia e innovación por la concesión del proyecto titulado “Análisis funcional de genes de la familia GRAS en el enraizamiento de especies forestales”. AGL2008-05105-C02-02/FOR
- La Xunta de Galicia por la concesión del proyecto titulado “Caracterización de genes de castaño implicados en procesos morfogenéticos de interés para la propagación de árboles seleccionados”. 10MRU400033PR.
- El consejo superior de investigaciones científicas (CSIC) mediante la concesión de la beca predoctoral JAE
- La Xunta de Galicia mediante la concesión de la beca para la realización de una estancia de investigación en el laboratorio de biotecnología forestal del IBET/ITQB-UNL (instituto de Biología experimental e Tecnológica / Instituto de Tecnología Química e Biológica – Universidade Nova de Lisboa), Oeiras, Lisboa.





*Dedico esta tesis a mis padres María del Carmen y Antonio,  
A mis hermanos María del Val y Álvaro,  
Al resto de mi familia especialmente a Álvaro y Gonzalo  
Y al resto de indispensables que estáis en mi vida.*



## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Dra. María Concepción Sánchez Fernández por darme la oportunidad de realizar con ella este proyecto, por toda la atención prestada a lo largo de estos años, con su absoluta disposición en todo momento y su despacho siempre abierto.

A la Dra. Celia Miguel del ITQB, por proporcionarnos el material de *Populus* que se ha empleado en este trabajo y por acogerme y tratarme como una más de su grupo durante los tres meses que estuve en Oeiras aprendiendo de toda la experiencia del grupo de biotecnología forestal. Y por supuesto muchísimas gracias a todo su grupo.

Son muchas las personas con las que he trabajado directa o indirectamente y a las que no puedo dejar fuera de estos agradecimientos, porque no solo habéis sido compañeros de trabajo sino que habéis sido una parte fundamental en mi vida en estos últimos 6 años. Son muchos los buenos momentos que hemos pasado tanto dentro del IIAG como fuera. A Puri, la mitad de esta tesis es mérito tuyo porque has sido profesora, psicóloga, compañera y red de seguridad, como te admiro por todo esto. Gracias por ser indispensable y no fallar nunca. A Saleta mi Compañera en mayúscula tantísimas horas, en todo y si he llegado hasta aquí ha sido gracias a que tú has tirado de mí cuando yo quería tirar la toalla. Anita entre otras cosas porque tú me acogiste desde el primer día y me enseñaste a moverme en el laboratorio con una paciencia infinita. A Anxela y a Brais, sin llegar a trabajar nunca directamente con vosotros, en poco tiempo ya formasteis parte fundamental de la rutina diaria y para mí más que compañeros sois amigos insustituibles e irremplazables, cada uno a vuestra manera únicos. A Jesús y Nieves por estar ahí siempre, por preocuparos tanto por mí y por vuestros sabios consejos. Y para terminar a los dos hermanos Maruxa, aunque te riña sabes que te adoro y José Manuel mi gran ayudante y compañía durante la preparación de los medios de cultivo. No os imagináis lo que os voy a echar de menos.

A mis compañeros de departamento Elena, Tere, M<sup>a</sup> José, José Carlos, Raquel, M<sup>a</sup> Carmen, Javier y Vanesa a nivel de trabajo todos en algún momento me enseñasteis algo sin lo que no hubiera llegado hasta aquí. Escribiendo estas líneas recuerdo algunos momentos en los que yo andaba despistada y perdida por los pasillos del centro y aparecía alguno de vosotros como la voz de la experiencia y con un par de consejos me hacíais ver la luz. Pero también muchísimas gracias por la cantidad de buenos momentos que hemos compartido y por la compañía. También vosotros sois responsables de que yo haya llegado a este punto. Trabajar nunca va a ser lo mismo. A las últimas incorporaciones del departamento, lo poco que hemos coincidido ha sido un placer y os agradezco que trajerais energías renovadas.

También tengo mucho que agradecer a la gente que pasasteis temporalmente por aquí pero que habéis formado parte de esto tanto como los demás. Silvia, aunque sé que odias que lo diga, eres mi ejemplo a seguir y posiblemente una de las personas que más me ha enseñado. A Carmen, fue un placer, creo que hicimos muy buen equipo y he echado mucho de menos seguir trabajando contigo. Blandina eres todo un ejemplo de trabajo y energía y a nivel personal muchísimo más. Enrique te recuerdo como la voz de la experiencia, aprendí y disfrute muchísimo aprendiendo contigo. Eva recuerdo con especial cariño cuando empezamos casi a la vez en este centro. Vero, Begoña, Lupa, Rubén y Raquel os agradezco sinceramente esos buenos momentos que se me vienen a la cabeza.

De Carmen y Puri, aunque me repita, tengo que hacer una mención más porque parte de esta tesis es vuestra y por eso era importante para mí que la portada de este libro llevara vuestra firma.

Al personal administrativo, Mili, Aurora y Sole, sois excepcionales y siempre que he necesitado algo habéis hecho fácil hasta las cosas más difíciles. El personal de apoyo del centro sin el que esto tampoco funcionaría y entre ellos sería injusto no destacar a Fina porque el cuidado y el cariño que he recibido de ti no tienen precio. A los compañeros del departamento de bioquímica del suelo con los que también hemos pasado muy buenos momentos y en especial a esas becarias con las que como es normal, siento más afinidad y en las que he encontrado comprensión y apoyo en los momentos de frustración por lo que pasamos a lo largo de estos años.

A todos los de prácticas porque de todos y cada uno de vosotros también he aprendido algo y aunque no puedo mencionar explícitamente a todo el mundo os guardo un muy bonito recuerdo.

A la gente con los que empecé en este mundo de la biología Davinia, Javi, José, Violeta, Ana, Eva, Leti, Salva, José e Ines. Y también a los que me fui encontrado a lo largo de la licenciatura y el master, en especial a Néstor e Isa. Y con ellos a los que me habéis acompañado durante muchos años especialmente a Sara y Vicky.

A mis compañeros de piso Nieves, Néstor y Fátima que habéis estado desde el principio al final de esta historia y sobre todo en estos últimos momentos habéis impedido que perdiera la cabeza. Pero también a Ángela, Patri y Nuria porque me ayudasteis a ver que había más mundo fuera.

A sobretodo tengo que dar las gracias a mi familia, porque sois mi gran pilar y por vuestro apoyado incondicional. Soy muy afortunada de teneros. Muchas, muchas gracias por todo y por lo que os queda por aguantarme.

# Índice De Contenidos

Glosario de abreviaturas.....	V
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. La biotecnología Forestal .....	3
2. <i>Castanea sativa</i> .....	8
3. <i>Populus spp</i> .....	11
4. Aspectos fisiológicos y morfológicos del enraizamiento adventicio .....	14
5. Factores determinantes de la capacidad rizogénica .....	18
5.1. Factores ambientales .....	19
5.1.1. La luz .....	19
5.1.2. Nutrición mineral.....	20
5.1.3. Los azúcares o carbohidratos.....	22
5.1.4. La temperatura.....	23
5.2. Factores endógenos .....	23
5.2.1. Control hormonal.....	23
5.2.1.1. Auxinas.....	24
5.2.1.2. Citoquininas.....	33
5.2.1.3. Giberelinas.....	34
5.2.1.4. Etileno.....	37
5.2.1.5. Otras hormonas.....	39
5.2.2. El estado ontogenético del material.....	40
6. mecanismos moleculares implicados en el proceso de formación de raíces adventicias .....	45
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>A. <i>Castanea sativa</i> .....</b>	<b>55</b>
1. Material vegetal .....	55
1.1. Líneas de cultivo.....	55
1.2. Mantenimiento de los brotes en proliferación .....	56
2. Enraizamiento.....	56
2.1. Tipos de explantos .....	56

2.2. Inducción de raíces adventicias en brotes.....	57
2.3. Inducción de raíces adventicias en hojas.....	57
2.4. Efecto del NPA sobre la respuesta rizogénica del castaño.....	58
2.4.1. Efecto del tiempo de exposición al NPA en brotes.....	58
2.4.2. Efecto del momento y tiempo de aplicación del NPA en hojas.....	58
2.5. Toma de datos y análisis estadístico.....	59
3. Material recogido.....	60
4. Análisis histológico.....	62
5. Identificación de secuencias génicas.....	62
5.1. Extracción y cuantificación del ARN.....	62
5.2. Obtención de las secuencias génicas.....	63
5.2.1. Diseño de cebadores.....	63
5.2.2. Síntesis de ADNc, RACE y PCR.....	64
5.3. Clonación y secuenciación.....	65
5.3. Análisis bioinformático.....	66
6. Análisis de expresión.....	69
6.1. qPCR.....	69
6.1.1. Retrotranscripción y condiciones de reacción.....	69
6.1.2. Diseño de cebadores.....	70
6.1.3. Evaluación de los resultados y análisis estadístico.....	71
6.2. Hibridación in situ.....	71
6.2.1. Síntesis de las sondas.....	71
6.2.2. Hibridación.....	72
<b>B. Populus.....</b>	<b>73</b>
7. Material vegetal.....	73
7.1. Líneas de cultivo.....	73
7.2. Mantenimiento de los brotes en proliferación.....	74
8. Enraizamiento.....	74
8.1. Toma de datos y análisis estadístico.....	75
9. Material recogido.....	75
10. Análisis de expresión.....	76
10.1. Reacción histoquímica de $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	76



<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
<b>A. <i>Castanea sativa</i> .....</b>	<b>79</b>
1. Capacidad rizogénica.....	79
1.1. Inducción del enraizamiento en brotes .....	79
1.2. Efecto del tiempo de exposición con NPA en la capacidad rizogénica de los brotes .....	81
1.3. Capacidad rizogénica de diferentes tipos de explantos .....	83
1.3.1. Efecto del estado ontogenético de los explantos en la capacidad rizogénica .....	85
1.4. Efecto del medio de cultivo y del NPA en la capacidad rizogénica de hojas.....	86
1.5. Efecto del momento y tiempo de aplicación del NPA en hojas .....	89
2. Análisis histológico de órganos y del proceso de enraizamiento adventicio en castaño .....	92
3. Caracterización de secuencias génicas .....	97
3.1. Familia GRAS .....	97
3.1.1. <i>Castanea sativa</i> SCARECROW-Like 3 ( <i>CsSCL3</i> ).....	97
3.1.2. <i>Castanea sativa</i> SHORT ROOT 1 ( <i>CsSHR1</i> ).....	100
3.1.3. <i>Castanea sativa</i> SHORT ROOT 2 ( <i>CsSHR2</i> ).....	103
3.1.4. <i>Castanea sativa</i> SCARECROW 1 ( <i>CsSCR1</i> ).....	105
3.1.5. Análisis filogenético .....	107
3.2. Otros genes caracterizados .....	114
3.2.1. <i>Castanea sativa</i> Gretchen hagen 3.2 ( <i>CsGH3.2</i> ).....	114
3.2.2. <i>Castanea sativa</i> UDP-Glicosiltransferasa ( <i>CsUGT</i> ).....	119
3.2.3. <i>Castanea sativa</i> early nodulin 93 ( <i>CsENOD93</i> ).....	125
4. Análisis de la expresión génica .....	128
4.1. Niveles de expresión génica en diferentes órganos .....	128
4.2. Evaluación de la expresión génica durante la inducción y desarrollo de raíces adventicias.....	131
4.2.1. <i>CsERF1</i> ( <i>Castanea sativa</i> Ethylene transcription factors1).....	131
4.2.2. <i>CsSCL1</i> ( <i>Castanea sativa</i> SCARECROW-like 1).....	135
4.2.3. <i>CsRLK</i> ( <i>Castanea sativa</i> Receptor-like kinase).....	141
4.2.4. <i>CsGH3.2</i> ( <i>Castanea sativa</i> Gretchen hagen 3.2).....	144

4.2.5. Otros genes caracterizados.....	147
4.2.5.1. <i>CsSCL3</i> ( <i>Castanea sativa</i> SCARCROW-like 3).....	147
4.2.5.2. <i>CsSHR1</i> ( <i>Castanea sativa</i> SHORT ROOT 1) .....	150
4.2.5.3. <i>CsSHR2</i> ( <i>Castanea sativa</i> SHORT ROOT 2) .....	150
4.2.5.4. <i>CsENOD93</i> ( <i>Castanea sativa</i> early nodulin 93) .....	153
4.2.5.5. <i>CsUGT</i> ( <i>Castanea sativa</i> UDP-Glicosiltransferasa) .....	153
<b>B. <i>Populus</i></b> .....	157
5. Capacidad rizogénica.....	157
6. Análisis de expresión.....	161
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>167</b>
<b>A. <i>Castanea sativa</i></b> .....	<b>169</b>
1. Respuesta rizogénica a la aplicación de auxinas .....	169
2. Respuesta rizogénica a la aplicación de NPA .....	175
3. Caracterización de las secuencias.....	180
3.1. Familia GRAS .....	180
3.2. Familia GH3 .....	183
3.3. Familia Glicosiltransferasa (GTs)/UDP- Glicosiltransferasa (UGT) .....	184
3.4. Familia Nodulina/Early Nodulin .....	186
4. Análisis de la expresión.....	187
4.1. Expresión en diferentes órganos.....	187
4.2. El enraizamiento adventicio .....	193
4.2.1. El nicho de células competentes para el enraizamiento adventicio en castaño y el desarrollo radicular .....	193
4.2.2. Expresión génica en la inducción y desarrollo del enraizamiento adventicio en función del estado ontogenético del material .....	194
4.2.3. Pérdida de capacidad rizogénica con la maduración .....	208
4.2.4. Inducción y desarrollo del enraizamiento adventicio .....	210
<b>B. <i>Populus</i></b> .....	<b>213</b>
5. Respuesta rizogénica a la manipulación hormonal.....	213
6. Análisis de expresión del gen <i>PtSHR1</i> .....	215
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>221</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>225</b>

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

2,4D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3' y 5' UTR	3' y 5' “ <i>untranslated región</i> ”, región no traducida o no codificante
ABA	Ácido abscísico
ABCB	“ <i>ATP-Binding Cassette Type B</i> ”, casete de unión al ATP Tipo B
ABP1	“ <i>Auxin Binding Protein I</i> ”, proteína de unión a auxinas 1
AFBs	“ <i>Auxin signalling F-Box proteins</i> ”, proteínas de señalización de auxina F-box
AG	Ácido giberélico
AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido 3-indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
ARFs	“ <i>Auxin response factors</i> ”, factores de respuesta a auxinas
AUF	“ <i>Auxin up-regulated F-box</i> ”, caja F promovida por auxinas
AUX1	“ <i>Auxin Resistant I</i> ”, resistente a auxina 1
Aux/AIA	“ <i>Early auxin-responsive genes of auxin/indoleacetic acid</i> ”, genes de respuesta temprana a auxinas
BA	6-Benciladenina
BLAST	“ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”, herramienta básica de alineamientos locales
CDKs	“ <i>Cyclin-dependent protein kinases</i> ”, ciclinas dependiente de quinasa
CQ	Centro quiescente
Ct	“ <i>Cycle Treshoold</i> ”, ciclo umbral
Dipping	Inmersión basal de los brotes
EA	Enraizamiento adventicio
ENOD	“ <i>Early nodulin</i> ”, nodulinas tempranas
ERF	“ <i>Ethylene response factors</i> ”, factor de respuesta a etileno
ES	Embriogénesis somática
ESTs	“ <i>Expressed Sequence Tags</i> ”, etiquetas de secuencias expresadas
Fw	“Forward”
GAI	“ <i>Giberellin-Acid Insensitive</i> ”, insensibles al ácido giberélico
GD	Medio Gresshoff y Doy
GH3	“ <i>Gretchen Hagen 3</i> ”
GID	“ <i>Gibberellin insensitive dwarf</i> ”
GTs	Glicosiltransferasas
GUS	Reacción histoquímica de la $\beta$ -glucuronidasa
H	Histona

LAX	<i>“Like Auxin-Resistant”</i> , tipo resistente a auxina
LHRs	Motivos <i>“Leucine Heptad Repeat”</i> , región rica en residuos de leucina
MDR	<i>“Multidrug resistant”</i> , resistente a múltiples fármacos
MS	Medio Murashige y Skoog
NLSs	<i>“Nuclear localization signals”</i> , señales de localización nuclear
NBP	<i>“NPA-binding protein”</i> , proteínas de unión a NPA
NPA	Ácido N-1-Naftil-ptalámico
P2C	Clon P2, línea obtenida de la copa
P2Rb	Clon P2, línea obtenida de renuevos basales
PIN	PIN-Formed, canales de eflujo de auxinas
PLT	<i>“Plethora”</i>
PGP	<i>“P-Glycoprotein”</i> , fosfo-glicoproteína
PSPG	<i>“Plant Secondary Product Glycosyltransferase box”</i>
QTLs	<i>“Quantitative Trait Loci”</i> , loci de rasgos cuantitativos
RACE	<i>“Rapid Amplification of cDNA Ends”</i> , amplificación rápida de los extremos del ADNc
RAPD	<i>“Random Amplified Polymorphic DNA”</i>
RAs	Raíces adventicias
RGA	<i>“Repressor of Giberellin”</i> , represor de giberelina
RLK	<i>“Receptor-like kinases”</i> , tipo receptor quinasa
RLs	Raíces laterales
Rv	<i>“Reverse”</i>
SERK	<i>“Somatic embryogenesis receptor kinase”</i> , marcador de la embriogénesis somática, receptor de tipo quinasa
SCR	<i>“Scarecrow”</i>
SCL	<i>“Scarecrow-Like”</i> , tipo Scarecrow
SHR	<i>“Short-Root”</i>
TIBA	Ácido Triiodo-benzoico
TIR	<i>“Transport Inhibitor Response”</i> , respuesta de inhibición de transporte
Tm	Temperatura de <i>“melting”</i> (fusión)
TPA	Transporte polar de auxinas
UPM	<i>“Universal Primer Mix”</i> , Mezcla de Cebadores Universal
UGT	UDP-Glicosiltransferasa

# Introducción





# 1. LA BIOTECNOLOGÍA FORESTAL

Las masas forestales tienen un gran valor tanto ambiental, por su participación en los ciclos del carbono, el oxígeno y el agua (entre otras funciones ecológicas), como económico, ya que tradicionalmente han sido una importante fuente de materias primas para la industria energética, de construcción, maderera, celulósica, alimenticia y farmacéutica. Se sabe que ciertos compuestos extraídos del castaño presentan propiedades antioxidantes, anticancerígenas y cardioprotectoras (Braga *et al.*, 2015) y en los últimos años se han encontrado nuevas aplicaciones farmacológicas, como la protección de la piel frente a los daños generados por la radiación ultravioleta (Almeida *et al.*, 2015) o la inhibición del efecto virulento de *Staphylococcus aureus* (Quave *et al.*, 2015). Además, las masas forestales son consideradas un gran recurso renovable con bajos costes de manejo. La biotecnología forestal ha aportado nuevas herramientas para la mejora, propagación, conservación y estudio de las especies leñosas. Para ello se ha trabajado en la secuenciación genómica, con la que identificar marcadores moleculares de caracteres deseables y conocer las bases moleculares de los procesos de desarrollo de la planta. También se han desarrollado protocolos de transformación genética para la obtención de individuos mejorados por su resistencia a enfermedades y estreses climáticos y para la alteración de las rutas de metabolismo secundario (la ingeniería metabólica) implicadas en la obtención de ciertas materias primas de interés para diversas industrias (Suzuki y Suzuki, 2014). Esta disciplina (la biotecnología forestal) pretende aumentar la calidad y cantidad de producción forestal, aportando las herramientas necesarias para acelerar el proceso de mejora, proceso que se ve frenado por la larga etapa juvenil de sus individuos y por su gran tamaño (Campbell *et al.*, 2003).

La propagación de ciertas especies leñosas, como el castaño, se ve muy limitada por el carácter recalcitrante de sus semillas (Ellis, 1991), que son tremendamente sensibles a la sequedad y a las bajas temperaturas lo que impide que sean conservadas y almacenadas largos periodos de tiempo sin perder viabilidad. Además, los individuos adultos presentan escasa capacidad morfogénica, lo que limita las posibilidades de propagación vegetativa empleando los métodos convencionales. Ante estos problemas, la biotecnología trata de buscar alternativas para la propagación clonal de genotipos élite empleando herramientas como el cultivo *in vitro*.

La propagación *in vitro* de especies vegetales surge gracias a la capacidad totipotente de las células vegetales, que permite regenerar una planta completa a partir de cualquier célula del organismo, tal y como quedó demostrado a mediados del siglo pasado por Steward *et al.*

(1958a) al regenerar plantas de zanahoria. Aunque las primeras plántulas de especies forestales obtenidas mediante cultivo *in vitro* se obtuvieron en los años 60, para algunas especies los procedimientos de micropropagación todavía están en fase de desarrollo, principalmente debido a la tremenda dependencia entre la respuesta del cultivo y el genotipo (de Klerk *et al.*, 1999; Fernández-Lorenzo *et al.*, 1999; Covelo *et al.*, 2009). Ello implica la necesidad de ajustar cada protocolo al material de trabajo y no poder establecer parámetros estándar óptimos. Existen tres vías principales para llevar a cabo la micropropagación *in vitro* (Thorpe *et al.*, 1991): embriogénesis somática (ES), inducción de yemas adventicias y proliferación de yemas axilares.

- *La embriogénesis somática* es un proceso embriogénico asexual que consiste en la desdiferenciación de células somáticas y su reprogramación y organización formando estructuras bipolares con un sistema vascular independiente de las células parentales. Estas estructuras dan lugar a embriones morfológica y fisiológicamente similares a los embriones zigóticos, pero sin que tenga lugar la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986). La ES tiene un gran potencial biotecnológico, debido a la gran capacidad de proliferación y a su gran potencial para la transformación genética, permitiendo no solamente la propagación sino también la criopreservación de germoplasma y la mejora genética. Asimismo, presenta tremendas dificultades para su inducción, especialmente a partir de material adulto, siendo la etapa de germinación y conversión a plántula uno de los principales cuellos de botella en el proceso de producción de planta. El primer trabajo que describe la inducción de embriones somáticos en castaño (*C. sativa*) fue publicado por Viéitez *et al.*, en 1990. Desde entonces se ha trabajado en la evaluación de los factores determinantes del proceso de inducción, mantenimiento, proliferación, maduración, germinación y conversión a planta (revisado en Corredoira *et al.*, 2005). A pesar de los avances de este campo, la producción a gran escala de especies forestales mediante ES es muy escasa, por ello en la actualidad se está trabajando en el estudio de nuevas herramientas biotecnológicas que reduzcan los costes (Park *et al.*, 2014; Thompson, 2014) y en el conocimiento de las bases moleculares que determinan cada una de las etapas de este proceso, de las que todavía se conoce muy poco (Smertenko y Bozhkov, 2014).
- *La inducción de yemas adventicias* (caulogénesis) es un proceso organogénico que consiste en la formación de meristemos caulinares adventicios mediante tratamientos con reguladores de crecimiento, principalmente citoquininas. El proceso de producción de plántulas mediante caulogénesis requiere de tres etapas: inducción y desarrollo de las



yemas y enraizamiento adventicio (EA). En la inducción, las células somáticas revierten su estado de diferenciación e inician un nuevo proceso de desarrollo hacia la formación del meristemo, siendo fundamental el desarrollo y elongación de las yemas, para poder abordar la etapa de EA. La tercera y última etapa del proceso consiste en la inducción y desarrollo de raíces adventicias (RAs) para obtener la plántula completa. Esta etapa se ve tremendamente limitada por el efecto inhibidor de los reguladores de crecimiento (citoquininas) aplicados en la fase de inducción y debido a que la capacidad de enraizamiento es tremendamente dependiente del genotipo. La principal limitación de este sistema con respecto a la ES, es que no tiene lugar la formación simultánea del brote y la raíz, sino que se forman en dos etapas independientes con sus limitaciones (Brown y Thorpe, 1986). El sistema de inducción de yemas adventicias permite regenerar plantas a partir de pequeños grupos de células, lo que aporta una importante herramienta biotecnológica para la regeneración de plántulas a partir de células transformadas genéticamente (Reynolds, 1986). El primer éxito en este campo lo logró White en 1939 al obtener brotes a partir de callos de tabaco. En el caso del castaño, los primeros intentos de cultivo *in vitro* de callos en los que se describió diferenciación morfológica o histológica fueron realizados por Jacquiot en 1950. A raíz de estos avances se trabajó en la regeneración de tejidos y órganos a partir de callo, consiguiendo en un primer momento solo la obtención de RAs (Viéitez *et al.*, 1978) y más adelante se alcanzó la producción de yemas adventicias, y plántulas completas (González, 1981; Skirvin, 1981; San José *et al.*, 1984; Mulin *et al.*, 1999).

- La *micropropagación de yemas axilares* permite la proliferación de las líneas de cultivo mediante la división del brote y fomentando el desarrollo de las yemas preformadas aplicando reguladores de crecimiento (citoquininas). En esta vía no es necesaria la inducción de un nuevo meristemo, aunque la capacidad proliferativa se ve limitada por el número de yemas preformadas por cada brote y por la necesidad de una segunda etapa de EA (al igual que ocurría en la caulogénesis) para la obtención de plántulas completas capaces de aclimatarse a las condiciones *ex vitro*. Esta fase de rizogénesis es de nuevo un proceso organogénico y generalmente es una etapa limitante que reduce el potencial propagativo de esta técnica. La principal ventaja de la propagación *in vitro* mediante yemas axilares es la estabilidad genética de estas estructuras frente a la obtención de plántulas a partir de callos, en donde hay una mayor probabilidad de generar cambios genéticos y mutaciones. Encontramos diversos trabajos sobre el establecimiento y propagación *in vitro* de brotes de castaño mediante la proliferación de yemas axilares (Viéitez y Viéitez, 1980b;

Keys y Cech, 1982; Viéitez y Viéitez, 1983; Gonçalves *et al.*, 1998), logrando muy buenos resultados en la propagación clonal de individuos seleccionados. Una de las principales dificultades en muchas especies como en el castaño, es la baja capacidad morfogenética del material adulto, ya que existe un declive de la capacidad rizogénica asociado con la edad (Díaz-Sala *et al.*, 1990; Sánchez y Viéitez, 1991; Greenwood y Hutchison, 1993; Díaz-Sala *et al.*, 1996).

Como hemos visto, el EA es una de las fases limitantes de la propagación *in vitro* y muy especialmente en especies forestales, siendo por ello es el objeto de estudio de esta tesis.

Hoy en día se están desarrollando nuevas aplicaciones biotecnológicas para el cultivo de tejidos vegetales. En muchas especies las raíces presentan el mayor reservorio de metabolitos secundarios de interés entre los que se encuentran los alcaloides, poliacetileno, sesquiterpenos, naftoquinonas y antraquinonas (Sivanesan y Jeong, 2009; Baque *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). El cultivo de RAs presenta ciertas ventajas para la producción a gran escala de estos metabolitos secundarios, de interés desde el punto de vista alimenticio o medicinal, ya que en muchos casos las raíces acumulan una gran cantidad de estos compuestos y presentan un crecimiento rápido y una producción estable e ilimitada de biomasa (Nandagopal y Kumari, 2007). Cabe citar el cultivo de raíces de achicoria, en donde el sistema radicular es cultivado de forma independiente para aumentar su biomasa y la producción de compuestos de interés (Nandagopal y Kumari, 2007), así como la obtención de aloe-emodina cuya concentración es unas 100 veces mayor en las raíces, que en las hojas de aloe (Lee *et al.*, 2011), o el cultivo de *Eurycoma longifolia* debido a sus propiedades afrodisíacas y antimalaria (Hussein *et al.*, 2012). En otras ocasiones se ha recurrido a la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes* para inducir el desarrollo radicular para la producción de metabolitos (Jenifer *et al.*, 2012).

Estos tres métodos de propagación requieren de procesos organogénicos que pueden desarrollarse por dos vías: directa o indirecta. En la vía directa las células somáticas diferenciadas se desdiferencian, reprograman, adquieren el nuevo destino celular y desarrollan el nuevo órgano. En la vía indirecta, las células desdiferenciadas proliferan formando un callo y serán algunas de las células de este callo las que continuarán con el proceso organogénico, reprogramándose y diferenciándose hacia la formación del órgano. En función de la especie, de los tratamientos y de los objetivos del cultivo de tejidos, puede ser necesario o conveniente el empleo de una u otra vía. Por ejemplo en los últimos años se han propuesto nuevos protocolos de regeneración de castaño mediante organogénesis indirecta como una vía alternativa para la obtención de plántulas transformadas, para el estudio de fusión de

protoplastos y la obtención de plántulas libres de virus (Tafazoli *et al.*, 2013). Una de las diferencias entre estas dos vías que ha de tenerse en cuenta, es que la indirecta genera un mayor número de modificaciones genéticas que pueden producir anomalías o pérdidas de caracteres de interés. Como en el resto de procesos organogénicos, el EA también puede tener lugar de forma directa, a partir de células diferenciadas, o indirecta tras la formación de callo.

En el cultivo de tejidos vegetales debemos tener en cuenta que, aunque se trata de una propagación clonal, pueden aparecer ciertas variaciones en las plantas regeneradas; estas variaciones fenotípicas, conocidas como variaciones somaclonales se atribuyen a modificaciones genéticas y epigenéticas (de las que hablaremos más adelante con más detalle). La variación somaclonal puede considerarse tanto beneficiosa como perjudicial, dependiendo de los objetivos (Miguel y Marum, 2011). En la ES puede incrementarse las variaciones somaclonales a medida que aumenta la edad del cultivo debido a la metilación del ADN, cambios que se traducen en una reducción del potencial embriogénico y organogénico del cultivo (Valledor *et al.*, 2007). En la micropropagación de yemas axilares de pino se han observado respuestas contradictorias, ya que a medida que aumentan el número de subcultivos, puede tener lugar cierto grado de rejuvenecimiento de los brotes (Webster y Jones, 1989), lo que conlleva un incremento de su plasticidad de respuesta a cambios exógenos y, por tanto, fomenta la capacidad de adaptación y supervivencia al ser transferidos *ex vitro* (revisado en Valledor *et al.*, 2007). Por el contrario, puede provocar envejecimiento y la transición de juvenil a adulto acortando el tiempo requerido para la floración (de Klerk, 2002).

Actualmente se sigue trabajando en la optimización de protocolos de cultivo *in vitro* con la finalidad de reducir costes y aumentar la eficiencia de producción. Se ha evaluado el empleo de diferentes tipos de explanto, de soporte, de biorreactores de mayor volumen o de sistemas de inmersión temporal. Con ello se busca establecer protocolos y herramientas para la propagación a gran escala (Troch *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2015), para la obtención de líneas libres de patógenos o líneas resistentes tanto a estreses bióticos como abióticos empleando el cultivo *in vitro*. Diversos trabajos de nuestro laboratorio han permitido alcanzar notables avances en el cultivo *in vitro* y en el estudio en profundidad de diversos aspectos fisiológicos y moleculares del desarrollo de varias especie leñosas como el castaño (Viéitez y Viéitez, 1980a; Viéitez *et al.*, 1986, 1990, 2007; Sánchez y Viéitez, 1991; Ballester *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 1997b; Corredoira *et al.*, 2004, 2005, 2012; Pereira-Lorenzo *et al.*, 2012), el roble (Viéitez *et al.*, 1985, 1993, 1994, 2009; San José *et al.*, 1988; Sánchez *et al.*, 1996b; Cuenca *et al.*, 1999; Toribio *et al.*, 2004), el haya (Cuenca y Viéitez, 1999; Cuenca,

1999), el eucalipto (Corredoira *et al.*, 2014, 2015), la camelia (Plata *et al.*, 1991; San José y Viéitez, 1993) y el aliso (Corredoira *et al.*, 2013; San José *et al.*, 2014).

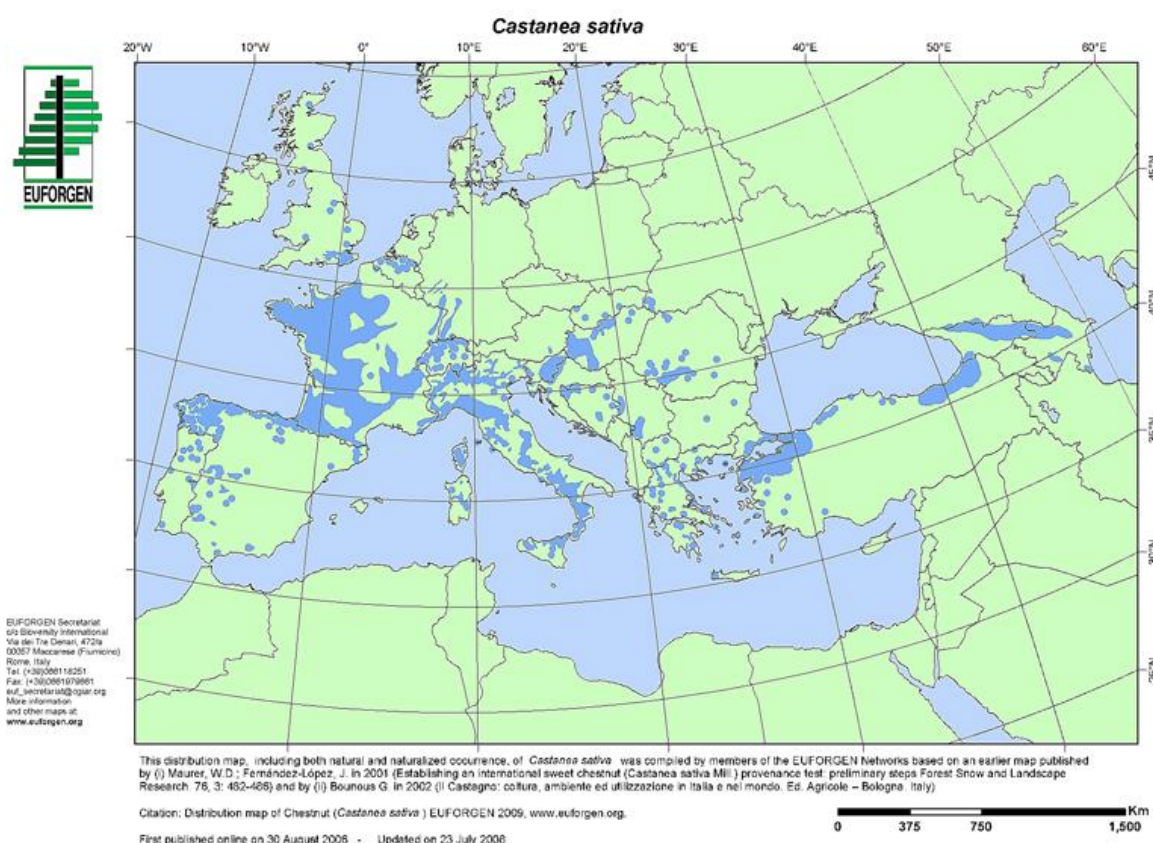
## 2. *Castanea sativa*

El castaño es una especie forestal de gran importancia por su valor ambiental, industrial y sociocultural, con un arraigo especial en la cultura y gastronomía gallega. Pertenece a la familia Fagaceae, que incluye aproximadamente 1000 especies, entre las que se encuentran algunas tan emblemáticas en nuestro país como el haya, los robles y encinas y el castaño. El género *Castanea*, de origen asiático, se distribuye de forma natural en bosques templados del hemisferio norte. Presenta un nivel muy bajo de variación morfológica y de divergencia molecular (Lang *et al.*, 2006). En Asia encontramos cuatro especies: *C. crenata* Siebold y Zuccarini, *C. Mollissima* Blume, *C. henryi* (Skan) Render y Wilson y *C. seguinii* Dode. En América del Norte encontramos otras dos especies: *C. dentata* (Marshall) Brokhausen y *C. pumila* (Linnaeus) Miller y en Europa destacamos la única especie de origen europeo, objeto de este estudio, *Castanea sativa* Miller. El castaño es una especie diploide ( $2n = 24$ ) que se estima que presenta aproximadamente 25.000 genes (Jaynes, 1962; Maynard *et al.*, 2008). Parece ser que la estructura y organización genómica de la familia Fagaceae está muy conservada y se caracteriza por presentar una proporción muy baja de secuencias repetidas (Casasoli *et al.*, 2006).

El género *C. sativa* M. o castaño europeo presenta una amplia distribución en las zonas de clima templado del sur de Europa (Fig. 1). En España se distribuye a lo largo de la zona atlántica, ocupando áreas desde el nivel del mar a altitudes superiores a los 1000 metros (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2012). Las áreas de distribución natural del castaño han ido desapareciendo debido al declive en el uso de la castaña, al abandono de las plantaciones y por la aparición de nuevas plagas. Las epidemias de chancro, sufridas a causa de la introducción accidental del hongo *Cryphonectria parasítica* (Murr.) Barr y las de la enfermedad de la tinta, causadas por el hongo *Phytophthora spp.* (principalmente por *P. cinnamomii* y *P. cambivora*), son dos de las enfermedades más importantes que afectan a esta especie y que han causado una gran pérdida de calidad y cantidad de producción tanto de madera como de fruto. Por ello, se han estado buscando nuevas herramientas que permitan la restauración del castaño. En un principio se abordó la obtención de híbridos, desarrollando retrocruzamientos entre el castaño americano (*C. dentata*) (Burnham, 1988; Diskin *et al.*, 2006) o el castaño europeo (Viéitez, 1952, 1960; Fernández *et al.*, 1993) sensibles a dichas enfermedades, y las especies asiáticas (*Castanea mollissima* (Blume) y *C. crenata* (sieb. y



Zucc.) que son resistentes, para la obtención de individuos con la resistencia adquirida de la especie asiática. En Estados Unidos, “The American Chestnut Foundation” creó un programa de propagación de híbridos (Hebard, 2005). El problema de estos programas de mejora convencionales es que pueden llevarnos a perder ciertas características importantes, específicas de la especie nativa y a incorporar características indeseables de la especie asiática. Además, la reproducción sexual de los individuos resistentes puede conducir a la pérdida de resistencia, por lo que es conveniente establecer herramientas apropiadas para la propagación vegetativa de los individuos seleccionados (Viéitez, 1952).



**Figura 1:** Mapa de la distribución geográfica del castaño europeo (*Castanea sativa*) evaluada por EUFORGEN en el 2009 (www.euforgen.org).

En Galicia ya se han implantado ciertas iniciativas para la conservación, como la elaboración de un catálogo del material frutícola gallego, y ya en 1994 se inició la instalación de un banco de germoplasma que conserva cultivares de *C. sativa* procedentes de la comunidad gallega (Fernández *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 2008, 2010). Las principales líneas de trabajo van dirigidas a la clasificación de clones resistentes a la tinta en función de su vigor, a la lucha contra la enfermedad del chancro y a la elaboración de programas de mejora genética del castaño europeo. El plan forestal gallego pretende potenciar las áreas de ocupación del castaño, y para que la repoblación se lleve a cabo con éxito, el material vegetal empleado debe ser seleccionado con detenimiento en función de la calidad genética de los individuos

(que asegure la adaptación ecológica de la zona, la calidad de la madera y el fruto y la resistencia a enfermedades) y de su buen estado fisiológico (que asegure el arraigo y crecimiento en monte). Teniendo en cuenta estos criterios se están empleando variedades autóctonas de *Castanea sativa* e híbridos seleccionados y propagados vegetativamente (Rodríguez *et al.*, 2005; Cuenca *et al.*, 2009; González *et al.*, 2011; Cuenca *et al.*, 2013).

Los primeros estudios genéticos de esta especie se centraron en lograr herramientas que permitieran seleccionar lo antes posible individuos élite. En esta línea se identificaron “RAPD” (Random Amplified Polymorphic DNA) y “QTLs” (*quantitative trait locus*) de rasgos adaptativos relevantes en castaño (Casasoli *et al.*, 2001, 2004). Cada locus tiene un efecto pequeño o moderado en el comportamiento global de los individuos por lo que se deben identificar genes o grupos de genes concretos que puedan tener un efecto más definido y específico en el comportamiento del castaño y de esta manera poder explotar su potencial genético.

Hoy en día se siguen desarrollando nuevas herramientas biotecnológicas, muchas de ellas basadas en la ingeniería genética ya que ésta parece ser una de las vías más prometedora para la supervivencia de especies amenazadas por las nuevas circunstancias globales, como el castaño (Wheeler y Sederoff, 2009). Ya se han descrito los primeros protocolos de transformación génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en *Castanea sativa* (Seabra y Pais, 1998; Corredoira *et al.*, 2004) y se han desarrollado las primeras líneas transgénicas de *C. dentata*, que incorpora el gen *oxalato oxidasa* para adquirir resistencia al chancro (Maynard *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013a). Las líneas transgénicas de *C. sativa*, llevan incorporadas el gen *CsTL-1* que codifica para una proteína tipo osmotina (taumatina) que podría conferir resistencia a la tinta por su carácter antifúngico (Corredoira *et al.*, 2009, 2012).

Además, se ha puesto en marcha un programa de secuenciación a gran escala de los genomas de castaño americano y asiático para identificar los genes de resistencia que se han perdido evolutivamente o no son funcionales en la especie americana. Los avances de este proyecto pueden encontrarse en la página web: [www.fagaceae.org](http://www.fagaceae.org). En Europa son muy pocos los grupos de investigación que trabajan en la biología molecular de la especie, lo que ralentiza el avance debido a la escasez de conocimientos previos y la dificultad para poner a punto los protocolos de manipulación, análisis y diagnóstico. Las principales líneas de trabajo se centran en estudios relacionados con estreses bióticos y abióticos y con mecanismos de defensa (Pernas *et al.*, 1998, 2000; Schafleitner y Wilhelm, 2002; Sebastiani *et al.*, 2009;

Minibayeva *et al.*, 2015; Serrazina *et al.*, 2015) aunque también se han iniciado algunos trabajos sobre la caracterización genética de cultivares (Quintana *et al.*, 2015).

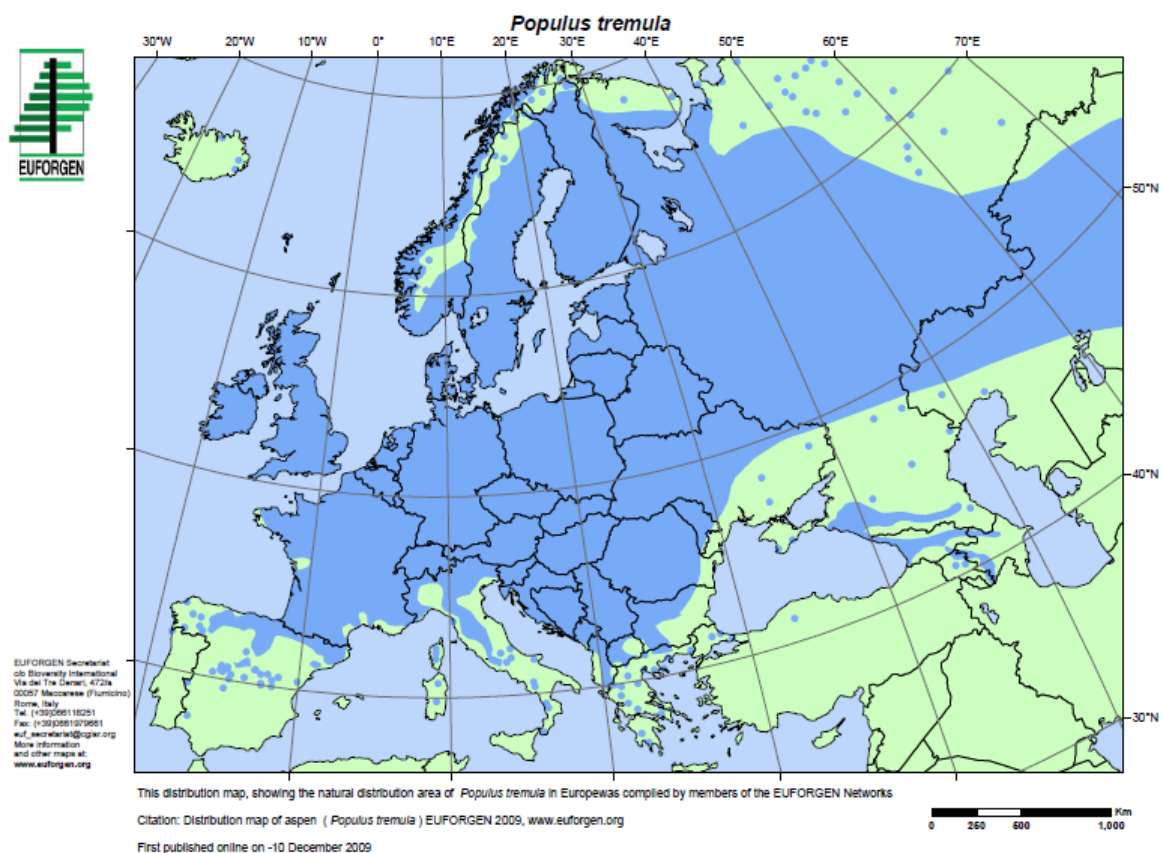
Para propagar individuos resistentes o seleccionados, se hace imprescindible su propagación vegetativa, y dado que el castaño es una especie de muy difícil enraizamiento esto complica su propagación clonal, bien mediante estaquillado o técnicas de propagación *in vitro*. Aunque se han descrito métodos eficientes en ambas líneas, la capacidad rizogénica depende enormemente del individuo y no siempre se ha logrado optimizar en el material seleccionado, por lo que se debería seguir profundizando en el conocimiento de los factores que la determinan para poder elaborar métodos estándar con el rendimiento adecuado (Chevre *et al.*, 1983; Sánchez y Viéitez, 1991). En nuestro laboratorio, utilizando los sistemas experimentales establecidos *in vitro*, se trabaja en el aislamiento e identificación de genes implicados en la morfogénesis y en procesos de desarrollo como son la ES y el EA (Sánchez *et al.*, 2007; Vielba *et al.*, 2011; Valladares *et al.*, 2013). También se lleva a cabo su caracterización, mediante el análisis espacio-temporal de la expresión, como una aproximación para entender su posible implicación en el proceso, las vías de actuación y los posibles mecanismos de control y regulación de la expresión.

### 3. *Populus spp.*

El chopo puede aportar diversos servicios ambientales irremplazables para el mantenimiento de los ecosistemas incluidos el secuestro de carbono, la fitorremediación de ambientes contaminados, evitar la erosión y como bioindicador de ambientes contaminados por ozono, la protección de las cuencas hidrográficas y como hábitat para la vida silvestre. Además de su valor ecológico, ha adquirido un gran valor económico que ha conducido a que hoy en día sea cultivado en todo el mundo para la obtención de fibras para la industria del papel y como fuente ligno-celulósica para la producción de biofuel y biomasa para la producción de electricidad (Flathman y Lanza, 1998; Bradshaw *et al.*, 2000; Zalesny y Zalesny, 2009; Stobrawa, 2014).

El género *Populus* pertenece a la familia Salicaceae. De acuerdo con la clasificación de Eckenwalder incluye 29 especies (Eckenwalder, 1996) aunque la taxonomía no es clara y existen clasificaciones que incluyen hasta 35 especies, las más empleadas en investigación son *P. tremula*, *P. tremuloides*, *P. trichocarpa*, *P. alba*, *P. nigra* y variedades híbridas de estas especies. Son árboles de hoja caduca dentro de los que se incluyen diversas especies de

chopos o álamos con una amplia distribución natural principalmente en el hemisferio norte (Bradshaw *et al.*, 2000), como ejemplo presentamos un mapa de la distribución de *Populus tremula*, una de las especie más estudiadas y de la que se empleó un híbrido en este estudio, donde observamos que prácticamente cubre toda la superficie de Europa (Fig. 2). Tienen una gran capacidad de colonización de ambientes perturbados pero suelen ocupar las llanuras de inundación fluviales, donde son un componente clave de los bosques de ribera (Braatne *et al.*, 1996). Todas las especies presentan gran capacidad de propagación vegetativa y rápido crecimiento y gran facilidad para hibridar generando híbridos fértiles, por lo que es muy frecuente el empleo de híbridos para generar segregación de ciertas características. Al igual que el castaño son especies diploides ( $2n = 38$ ).



**Figura 2:** Mapa de la distribución geográfica del chopo (*Populus tremula*) evaluada por EUFORGEN en el 2009. (www.euforgen.org).

*Arabidopsis* fue el primer sistema modelo utilizado, permitiendo el desarrollo de numerosas técnicas y herramientas para el estudio de la función génica en plantas. Pero a pesar de las ventajas de utilizar *Arabidopsis* muchas veces está muy lejos de reflejar lo que ocurre en las plantas en general, ya que podría considerarse el extremo opuesto en la fisiología y genética de muchos árboles (Jansson y Douglas, 2007). Por ello era necesario el desarrollo de un sistema modelo de especies forestales para ciertos estudios anatómicos y fisiológicos. En este sentido, el chopo era idóneo ya que presenta rápido crecimiento, gran



fertilidad, es fácil de clonar, presenta un genoma de pequeño tamaño, fácil de transformar genéticamente y regenerar individuos transgénicos y su estrecha relación entre sus rasgos fisiológicos y la productividad de biomasa (Bradshaw y Stettler, 1993; Bradshaw *et al.*, 2000). A principios del siglo XXI se sugirió el *Populus* como sistema modelo de árboles y plantas forestales, lo que generó un rápido desarrollo de recursos genéticos y moleculares para este género incluyendo la secuenciación del genoma completo de una de sus especies *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006). A raíz de la secuenciación completa de su genoma se han desarrollado diversas herramientas genéticas, genómicas y bioquímicas que ofrecen multitud de posibilidades para el estudio de ciertas cuestiones que no podían ser abordadas empleando los sistemas de plantas modelos anteriores en *Arabidopsis* y arroz. Los principales rasgos que no podían ser evaluados con los modelos anteriores son la formación de madera o xilema secundario, los hábitos de crecimiento perenne y la estacionalidad. Pero además, la adición de un árbol al grupo de sistemas modelos también ha contribuido al análisis de otros rasgos importantes como la floración, el cambio de fase, las interacciones bióticas y la evolución de los rasgos adaptativos (Bradshaw *et al.*, 2000; Jansson y Douglas, 2007).

El amplio rango de variaciones genéticas de la especie, que le permite la adaptación a la amplia área de distribución geográfica que ocupa, lo convierte en una herramienta muy útil para la evaluación de variación morfológica, anatómica, fisiológica, fenológica y la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Farmer, 1970; Orlovic *et al.*, 1998; Bradshaw *et al.*, 2000). Los recursos genéticos disponibles comenzaron con las primeras librerías de “ESTs” (Sterky *et al.*, 1998) y en paralelo al desarrollo de estas librerías, se desarrollaron otras herramientas de genómica funcional como los microarrays y multitud de estudios de proteómica y metabolómica. Los trabajos incluyen aspectos genéticos, fisiológicos y patológicos generando una productiva vía de investigación (Jansson y Douglas, 2007). Cabe destacar que el rápido crecimiento y respuesta fisiológica a las condiciones del medio permiten medir la respuesta a estreses bióticos y abióticos en periodos cortos de tiempo y elaborar mapas de “QTLs” que controlan la morfología, fenología y patología (Bradshaw y Stettler, 1995; Newcombe, 1996; Wu, 1998; Frewen *et al.*, 2000; Jorge *et al.*, 2005).

Además la facilidad para la obtención de individuos transgénicos gracias a su capacidad de transformación, la gran facilidad de propagación y la rápida regeneración es inigualable por cualquier otro tipo de árbol. El primer éxito de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de plántulas en una especie forestal se logró en un híbrido de *Populus alba x grandidentata* en 1987 (Fillatti *et al.*, 1987). En este caso se emplearon segmentos de hojas para la transformación pero también se han establecido protocolos

eficientes empleando otro tipo de explantos como entrenudos y peciolos (Tsai *et al.*, 1994; Han *et al.*, 2000; Yevtushenko y Misra, 2010). La transformación genética mediante *Agrobacterium*, se ha empleado para la mejora, la evaluación funcional de genes y el estudio básico de los procesos fisiológicos (Bradshaw *et al.*, 2000).

Un reflejo de la tremenda repercusión del empleo del chopo como especie modelo es el gran incremento en el número de publicaciones que lo emplearon como sistema, las cuales se duplicaron entre el 2006 y el 2010 (revisado en Stobrawa, 2014).

## **4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y MORFOLÓGICOS DEL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO**

La formación de RAs es un proceso organogénico postembriogénico, en el cual se induce su formación a partir de células diferenciadas que no estaban determinadas para formar raíces. En la propagación vegetativa de especies forestales, la formación de RAs es uno de los puntos críticos, además de ser un proceso muy poco conocido y muy variable en función de las especies y el genotipo. Pueden originarse de forma natural bajo condiciones de estrés ambiental a partir de tejidos del tallo (Pop *et al.*, 2011). El desarrollo de un sistema radicular completo con RAs y raíces laterales (RLs) es indispensable para proveer a la planta de la amplia red necesaria para la absorción de agua y nutrientes así como de un sistema de anclaje.

Para la formación de RAs, debe producirse la formación de un meristemo radicular “*de novo*” a partir de otro tejido preexistente. No se conocen los mecanismos por los cuales las células somáticas se desdiferencian, adquiriendo un carácter pluripotente que les permita desarrollar un nuevo órgano, ya sea una raíz, un brote, un embrión o reparar un daño en alguno de sus órganos. Las primeras células en las que se observó totipotencia pertenecían al tejido vascular (Steward *et al.*, 1958b). En el primer trabajo de regeneración de plántulas, desarrollado en zanahoria ya se observó que las raíces se formaban a partir del cambium y rara vez del floema (Steward *et al.*, 1958a). Se consideran células competentes aquellas que son capaces de responder a una señal hormonal concreta y cambiar el patrón de desarrollo pudiendo dar lugar, en función del estímulo, a una respuesta organogénica diferente como la ES o la formación de yemas o RAs. De Almeida *et al.* (2012) describieron las células precambiales como nicho de células multipotentes, pluripotentes o totipotentes que pueden dar lugar a la diferenciación vascular, a la organogénesis y a la ES en respuesta al balance de auxinas:citoquininas. Otro factor importante en la determinación del destino celular es la

posición de la célula en el organismo ya que cada célula interactúa con las células vecinas y su posición determina la vía de diferenciación que va a asumir (de Almeida *et al.*, 2012). Sin embargo, la aplicación de estímulos externos o estímulos ambientales puede generar la señal adecuada para que cambie el destino celular predeterminado, gracias a la plasticidad y el potencial morfogénico de las células vegetales (Baque *et al.*, 2010; Díaz-Sala, 2014).

Las RAs se desarrollan a partir de células vecinas del tejido vascular (Bellini *et al.*, 2014). El periciclo, las células parenquimáticas del xilema y el floema, el floema y el cambium contienen las células progenitoras en el desarrollo de RAs (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999; de Klerk *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009). En los brotes de castaño las raíces se originan en el cambium (Ballester *et al.*, 1999). En *Bractris gasipaes*, estudios histológicos determinaron que el tejido pre-procambial contenía el nicho de células competentes que respondían a la aplicación de reguladores de crecimiento activando diferentes rutas morfogénicas para dar lugar a nuevas yemas y embriones, sin embargo las RAs se originaban a partir de células parenquimáticas desdiferenciadas (de Almeida *et al.*, 2012). En pino son las células del parénquima vascular que recubren los canales resiníferos las que inician el proceso de EA (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Una vez inducido el proceso estas células se dividen rápidamente, reorganizando los planos de división para la formación el meristemo radicular.

En especies de fácil enraizamiento, como es el caso de *Populus* o *Arabidopsis*, la escisión de la zona basal del brote es suficiente para generar el estímulo necesario para la inducción del EA. Por el contrario, en especies con baja capacidad rizogénica, como son la mayoría de las especies forestales, se requiere la aplicación exógena de auxinas (Abarca y Díaz-Sala, 2009; Li *et al.*, 2009). Aun así, en muchas especies, en genotipos concretos o en material adulto de genotipos seleccionados no se ha logrado desencadenar el EA tras la aplicación de auxinas. En ambos casos, independientemente de que la inducción se produzca por escisión o mediante la aplicación exógena de auxinas, y al igual que ocurre con las RLs, las auxinas desencadenan el proceso organogénico, se produce la alteración de la distribución de auxinas y se modifican ciertos mecanismos moleculares induciendo el enraizamiento (Heloir *et al.*, 1996; de Klerk *et al.*, 1999). Además, probablemente tanto el proceso de desarrollo de RAs como RLs, compartan ciertos aspectos de las bases moleculares y hormonales de su desarrollo, pero están sujetos a diferentes mecanismos de regulación (Bellini *et al.*, 2014). Las auxinas inducen la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y con el programa de desarrollo que conduce a la formación de la raíz, pero parece necesario que previamente se

anule el patrón de desarrollo establecido en las células, se produzca la dediferenciación celular y la adquisición de competencia para responder al estímulo (de Klerk *et al.*, 1999).

El proceso de formación de RLs se puede dividir en tres fases fisiológicamente independientes (Kevers *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2009). En general se puede establecer un paralelismo entre la formación de RLs y RAs, aunque en este último caso se requiere un paso previo de dediferenciación celular (de Klerk *et al.*, 1999). De esta forma se han caracterizado cuatro etapas que tienen lugar durante el desarrollo de RAs:

- *Dediferenciación celular*: las células somáticas diferenciadas se dediferencian y adquieren carácter meristemático y competencia para responder al estímulo auxínico y formar un nuevo órgano.
- *Inducción*: Durante esta fase no tiene lugar ningún cambio histológico, pero sí importantes cambios bioquímicos y transcripcionales. Se produce la activación de las células que van a iniciar el desarrollo de la raíz antes de que comiencen a dividirse, en las primeras 24 horas. En las células activadas se observa la acumulación de almidón y la presencia de un núcleo muy patente y el nucléolo muy grande.
- *Iniciación*: las células activadas comienzan a sufrir divisiones periclinales y proliferar rápidamente formando acúmulos de células meristemáticas que formaran el meristemoide. Estas primeras divisiones suelen aparecer entre las 48 y 96 horas tras la aplicación del tratamiento.
- *Expresión*: se produce el crecimiento del primordio radicular que adquiere forma cónica y penetra a través del esclerénquima del brote hacia el córtex. En esta estructura, con cierto grado de organización, se establecen las células iniciales de la epidermis, endodermis y cofia. Antes de que se produzca la emergencia ya ha comenzado la diferenciación de la caliptra y el procambium. Termina con la emergencia de las raíces y la completa diferenciación de los tejidos radiculares, formándose la conexión de los haces vasculares del brote con los de las raíces, la vacuolización del córtex y la elongación de las células de la estela.

En el caso concreto de castaño, se han establecido cuatro etapas en el desarrollo de las RAs: dediferenciación celular, inducción de la división celular, desarrollo del primordio radicular y emergencia de las raíces (Viéitez *et al.*, 1981). Estos autores, además caracterizaron el proceso de desarrollo de la raíz adventicia dividiéndolo en cuatro estadios de desarrollo: meristemoides, primordios de raíz, primordio radicular con sistema vascular propio y raíz adventicia. Existen varios trabajos que describen de forma similar los cambios

anatómicos que tienen lugar durante el desarrollo de RAs en diversas especies como en arroz (Itoh *et al.*, 2005), manzano (Naija *et al.*, 2008) y en estaquillas (Biricolti *et al.*, 1994) y en brotes *in vitro* de castaño (Gonçalves *et al.*, 1998; Ballester *et al.*, 1999).

Las etapas fisiológicas que tienen lugar durante el desarrollo del EA presentan requerimientos diferentes, por ejemplo se sabe que las auxinas juegan un papel fundamental en el proceso pero de forma diferente en cada una de las etapas. En la fase de inducción se genera un pico máximo de auxinas, aproximadamente a una distancia entre 1-2 mm sobre la zona de corte y que corresponde con la zona donde se forman los primordios. Durante la fase de iniciación los niveles de auxina alcanzan los valores mínimos y en la fase de expresión se vuelven a incrementar los niveles de ácido 3-indolacético (AIA) libres (Blakesley *et al.*, 1991; Heloir *et al.*, 1996; de Klerk *et al.*, 1999; Pop *et al.*, 2011). Se puede establecer una correlación entre los niveles de auxina endógenos y las etapas fisiológicas del proceso de EA, siendo la distribución de auxinas en los tejidos determinante en la emergencia de las RAs (Xu *et al.*, 2005). En muchas especies es necesario retirar las auxinas del medio de cultivo tras la iniciación del proceso de EA para que tenga lugar el desarrollo de los primordios (Naija *et al.*, 2008). La aplicación exógena de calcio y su interacción con las auxinas afecta positivamente a la formación del meristemo radicular y su desarrollo, aunque un exceso en su concentración modifica la anatomía del primordio ya que induce la sobreproducción de xilema, la expansión de las células corticales y reduce el meristemo apical (revisado en Falasca *et al.*, 2004). Además en cada etapa del EA se producen grandes cambios en el patrón de expresión génica.

Cuando se establece la arquitectura final de la raíz podemos diferenciar tres zonas: la zona de diferenciación, la zona de elongación y la zona meristemática (E *et al.*, 2012). La zona de diferenciación es la parte más basal y próxima al tallo, presenta mayor grado de desarrollo que el resto y en ella ya se ha producido la emergencia de las RLs. La zona de elongación es la zona de crecimiento en la parte central de la raíz, donde tiene lugar la iniciación y el desarrollo de los primordios de RLs. En la zona de diferenciación y elongación encontramos una sucesión de capas concéntricas, que desde el exterior al interior están conformadas por los siguientes tejidos: la epidermis, el córtex, la endodermis y la estela, que incluye el cilindro vascular y el periciclo (Dolan *et al.*, 1993; E *et al.*, 2012). Finalmente, en la zona meristemática o ápice de la raíz encontramos el meristemo apical radicular con localización subapical, que contiene el centro quiescente (CQ) que dirige el crecimiento y desarrollo de la raíz, y la zona basal del meristemo, en la que se está produciendo la diferenciación de las diferentes capas de tejido radicular y a partir del periciclo la preiniciación de las RLs (Dastidar *et al.*, 2012). El CQ es el nicho de células iniciales

caracterizadas por presentar una baja tasa metabólica y dividirse lentamente. Estas células funcionan organizando las capas de células troncales impidiendo que se diferencien (Vernoux y Benfey, 2005). Rodeando el CQ encontramos cuatro capas de células troncales, cada una de ellas destinada al desarrollo de una de las capas de tejido radicular: la estela, la caliptra, la epidermis y el tejido basal compuesto por el córtex y la endodermis. Las células troncales controlan el crecimiento de la raíz, son células meristemáticas en continuo estado de división, que sufren divisiones asimétricas para dar lugar a una célula meristemática, que mantendrá el contacto con el CQ y conserva la identidad de célula madre, y a una célula que pierde el contacto con el CQ y adquiere una determinada identidad celular hasta que después de divisiones sucesivas entra en la zona de elongación y diferenciación (Scheres, 2007). Existe un complejo control entre el mantenimiento del meristemo radicular y el control de la diferenciación celular para dirigir el crecimiento de la raíz. En este proceso intervienen diferentes familias génicas y hormonas.

## **5. FACTORES DETERMINANTES DE LA CAPACIDAD RIZOGÉNICA**

Tanto el desarrollo de la planta como la organogénesis están dirigidos por la interacción de multitud de factores como los reguladores de crecimiento, la composición mineral del medio de cultivo, el estado fisiológico del individuo y otros factores bióticos y abióticos que pueden provocar los estímulos necesarios para que se desencadene un nuevo proceso de desarrollo. Para describir los factores que controlan el proceso de EA podemos diferenciar entre factores ambientales y endógenos, dentro de los que podemos distinguir entre aspectos fisiológicos y moleculares (De Klerk *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2009; Pop *et al.*, 2011).

En este trabajo, a la hora de evaluar las bases fisiológicas y moleculares que dirigen el EA, tendremos en cuenta dos de los principales factores que determinan la capacidad rizogénica, el estado ontogenético del material y las rutas de señalización hormonal que coordinan y dirigen todos los procesos de desarrollo de la planta. Existe una coordinación entre las diferentes rutas hormonales que se autorregulan para iniciar la respuesta ante diversos estímulos externos y responder de forma coherente para mantener la supervivencia del individuo.



## 5.1. FACTORES AMBIENTALES

### 5.1.1. La luz

La luz, ya sea tanto por su intensidad como por su longitud de onda, afecta a las condiciones de micropropagación *in vitro* de especies vegetales y por tanto al proceso de EA de forma directa, pero también condicionando el buen estado fisiológicos de sus brotes, su vigor y la elongación que son factores determinantes de la eficiencia del proceso de EA. Se ha demostrado que el crecimiento bajo diferentes regímenes de luz cambia los niveles endógenos de auxinas e influye en su homeostasis (revisado en Iacona y Muleo 2010).

Podríamos considerar la luz como inhibidor del enraizamiento al provocar la biosíntesis y acumulación de citoquininas, por lo que el cultivo en condiciones excesivas de irradiación puede inhibir el EA (Fett-Neto *et al.*, 2001; Geiss *et al.*, 2009). Los fotoreceptores participan en la regulación del EA, regulando la expresión de los “*Auxin response factors*” (ARFs) que promueven o inhiben la respuesta rizogénica y regula los canales de eflujo de auxinas (PIN-FORMED (PIN)). La luz inhibe la acción eficiente de las auxinas en la iniciación de RAs (Kurata y Yamamoto, 1997) por lo que en muchas especies es frecuente incluir un periodo de oscuridad durante la fase de inducción (Heloir *et al.*, 1996; Fett-Neto *et al.*, 2001; Falasca *et al.*, 2004; Naija *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2012). En castaño también se demostró que la inducción del EA era promovida cuando, además del tratamiento auxínico, los explantos eran sometidos a condiciones de oscuridad durante 5 días (Sánchez *et al.*, 1997b). Este efecto positivo puede ser debido a un descenso del nivel de peroxidasas inducido por la oscuridad (Druart *et al.*, 1982) y a un incremento de los niveles endógenos de auxinas. Ciertos compuestos fenólicos bloquean la oxidación de auxinas que se produce en condiciones de oscuridad y la fotooxidación en el cultivo *in vitro* (de Klerk *et al.*, 1999). La aplicación exógena de auxinas puede contrarrestar el efecto inhibidor del EA generado por la exposición a la luz sugiriendo que la luz inhibe el enraizamiento al generar cambios en la actividad auxínica (Fett-Neto *et al.*, 2001). Sin embargo, un periodo de oscuridad prolongado puede afectar negativamente a la calidad del brote, provocando necrosis y senescencia (Sánchez *et al.*, 1997b; Naija *et al.*, 2008).

Sorin *et al.* (2005) observaron en mutantes con diferente respuesta rizogénica y distinta sensibilidad a la luz, una interacción entre la luz y el metabolismo de la auxina que controla el enraizamiento. Estos autores encontraron niveles bajos de AIA en los mutantes (*ago1*) sensibles a la luz y con baja capacidad de enraizamiento. Es el gen *ARGONAUTE 1(AGO1)*,

mediado por la luz, el que regula directa o indirectamente la expresión de genes que controlan diferentes aspectos de la homeostasis de auxinas y el enraizamiento.

En trabajos más recientes se están empleando otro tipo de lámparas, como las LEDs, para evaluar su efecto en el EA. La planta presenta diferentes tipos de fotorreceptores: criptocromos, fototropinas y fitocromos, que monitorizan regiones con diferentes longitudes de onda del espectro y con ello regulan el desarrollo de la planta. La luz y la presencia de estos fotorreceptores hacen que se modifique la eficiencia de los reguladores de crecimiento en los diferentes órganos y tejidos. Por ejemplo, en *Morinda citrifolia* la inducción es más eficiente bajo luz fluorescente, pero la luz roja permite el desarrollo de un mayor número de raíces y la combinación de luz azul y roja generó mayor producción de biomasa. Sin embargo, en la producción de metabolitos secundarios, la luz roja lejana fue la que produjo mayor cantidad de antraquinonas, compuestos fenólicos y flavonoides (Baquero *et al.*, 2010). En otros trabajos se ha evaluado el efecto de la intensidad lumínica, el tipo de luz y la longitud de onda en el enraizamiento. En *Pinus pinea* L. se vio que el incremento de la intensidad de luz en general no promovió el EA, sin embargo la luz blanca fría incrementó el porcentaje de enraizamiento en más del 30%, esto puede deberse a que estas lámparas emiten más luz dentro del espectro del amarillo y el verde (Ragonezi *et al.*, 2010). Como ocurre con el resto de factores, cada especie puede presentar unos requerimientos de luz diferentes, por ejemplo en híbridos de *Prunus avium* L. x *Prunus cerasus* L. la aplicación combinada de luz azul y roja permitió desarrollar mayor número de raíces e incrementar la supervivencia durante la aclimatación a condiciones *ex vitro*. Por ello es importante tener en cuenta que el empleo de la iluminación adecuada puede influir cualitativa y cuantitativamente en el enraizamiento y con ello en la capacidad de aclimatación *ex vitro* de los cultivos (Iacona y Muleo, 2010).

### 5.1.2. Nutrición Mineral.

Los nutrientes minerales afectan al EA principalmente influyendo en el número de raíces desarrolladas y su tamaño. Parece ser que el calcio, la fuente de nitrógeno y el zinc afectan al número de raíces y el fósforo, el hierro, el manganeso y la fuente de nitrógeno a la longitud de las raíces (Geiss *et al.*, 2009). El efecto de los nutrientes varía en función de la especie y las condiciones ambientales.

Existen diversos medios de cultivo cuya composición se ha estandarizado y que se emplean con frecuencia en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales como son el medio Murashige y Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962), Gresshoff y Doy (GD; Gresshoff y Doy, 1972), “Woody plant médium” (WPM; McCown y Lloyd, 1981), Lloyd y McCown, (Lloyd y



McCown, 1980), Schenk y Hildebrandt (SH; Schenk y Hildebrandt, 1972), Gamborg B5 (B5; Gamborg *et al.*, 1968), Linsmaier y Skoog (LS; Linsmaier y Skoog, 1965) Heller (Heller, 1953) y Lepoivre (Quoirin y Lepoivre, 1977). En castaño se obtuvieron porcentajes de enraizamiento más altos y un mayor número de raíces en el medio MS que en el de Lepoivre, siendo las raíces más largas en el de Lepoivre (Viéitez y Viéitez, 1983). En la fase de EA es frecuente emplear la misma formulación que se emplea en la proliferación pero reduciendo la concentración de macronutrientes; LS $\frac{1}{2}$  para *Malus sylvestris* (Hutchinson, 1984) y MS $\frac{1}{2}$  para *Malus domestica* Borkh (Lane, 1979), sin embargo, para la proliferación de RAs en *Boerhaavia diffusa* L., el medio MS completo resultó ser más eficiente que cuando se redujo la concentración de macronutrientes.

**El nitrógeno** inhibe la elongación de RLs (Bellini *et al.*, 2014). En *Malus* la reducción de los macronutrientes del medio MS $\frac{1}{4}$  mejoró el enraizamiento aunque la mejor respuesta rizogénica se obtuvo al mantener el contenido en KNO<sub>3</sub> y eliminar el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Sriskandarajah *et al.*, 1990) lo que demuestra que además del nitrógeno, la fuente de aporte de nitrógeno es fundamental. El óxido nítrico (NO) es un mensajero celular de muchos procesos de desarrollo de la planta (Li *et al.*, 2009), actúa como mediador de la ruta de señalización auxínica que desencadena el EA, controla las divisiones celulares de las primeras etapas de la formación de los primordios de RLs y favorece la diferenciación de la raíz (Bellini *et al.*, 2014). Además existe una dependencia del NO en las fases de iniciación y elongación del desarrollo de RAs (Yadav *et al.*, 2010). Durante la maduración del individuo se reduce la formación de NO y con ella su capacidad rizogénica (Abu-Abied *et al.*, 2012). Recientes estudios demostraron que existe una respuesta auxínica al contenido en nitrato en el suelo, ya que las proteínas transportadoras de nitrato además de participar en la percepción y traducción de la señal de nitrato actúan sobre el influjo de auxinas alterando la formación de RLs (Swarup y Péret, 2012).

**El calcio** además de ser uno de los nutrientes básicos promueve el enraizamiento, por lo que el efecto de la adición de CaCl<sub>2</sub> fue evaluada de forma independiente en el trabajo de Falasca *et al.* (2004). Se ha comprobado que juega un papel fundamental en el EA, después de la fase de inducción, en el proceso de elongación del primordio ya que participa en la división celular y además es determinante en la fase de emergencia (Bellamine *et al.*, 1998). Se cree que actúa de forma conjunta a las auxinas ya que cuando hay un incremento de la concentración auxínica, aumenta el flujo de calcio a través de canales específicos y funciona como mensajero secundario de la interacción entre auxinas y óxido nítrico que activa el EA.

Otros nutrientes pueden ejercer un efecto diferente en el enraizamiento en función de la especie como por ejemplo *el fósforo*, cuya deficiencia en el medio de cultivo reduce la densidad y elongación de RLs en el eucalipto y el olivo y por el contrario tiene un efecto estimulador en *Arabidopsis* y arroz (revisado en Bellini *et al.*, 2014). También el *monóxido de carbono* y el *boro* pueden afectar al proceso regulando las auxinas (revisado en Xuan *et al.*, 2008).

### 5.1.3. Los azúcares o carbohidratos

Aunque en diversas especies se ha confirmado que la concentración de azúcares puede afectar al EA, tanto la concentración óptima como la fuente de carbohidratos más idónea varía en cada una de ellas (Thompson y Thorpe, 1987). En general, la glucosa, sacarosa y fructosa estimulan el EA, mientras que la manosa y el sorbitol no participan en el desarrollo de las raíces (Takahashi *et al.*, 2003). En manzano el sorbitol es el azúcar más eficiente, en *Eurycoma longifolia* la fructosa, galactosa y sorbitol no permiten el enraizamiento, sin embargo el empleo de glucosa durante la inducción aumenta el porcentaje de brotes enraizados y la sacarosa aumenta el número de raíces desarrolladas, preferentemente a concentraciones altas (50g/L) (Hussein *et al.*, 2012).

El efecto de los carbohidratos en el desarrollo del EA puede ser directo o indirecto. Para que exista una regulación directa debe existir una cascada de señalización específicamente inducida por los azúcares, alterando la expresión génica. En el caso de la regulación indirecta, participan en la señalización hormonal de la planta activando la biosíntesis y el transporte de auxinas y etileno (Takahashi *et al.*, 2003).

El efecto del carbono en la respuesta rizogénica va estrechamente relacionado con el del nitrógeno y debe ser analizado de forma conjunta, ya que la formación de RAs se ve condicionada por el contenido inicial de ambos nutrientes (Geiss *et al.*, 2009). Se ha comprobado que una elevada relación entre C/N inhibe la iniciación del EA (Bellini *et al.*, 2014). Además la glucosa puede actuar de forma similar a las hormonas en la regulación del crecimiento e interaccionar positivamente en la señalización auxínica durante la iniciación del EA (revisado en Hussein *et al.*, 2012).

A pesar de que los azúcares son esenciales para la actividad celular, niveles altos pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de la planta. En concreto en el desarrollo de la raíz, el gen *SCR* (*SCARECROW*) puede mitigar el efecto del exceso de glucosa en el meristemo apical reprimiendo la expresión de los genes *ABI4* y *ABI5* (insensibles a *ABA*, ácido abscísico) (Cui *et al.*, 2012).

#### 5.1.4. La temperatura

Aunque sí que se ha evaluado el efecto de la temperatura en el proceso de EA no parece ser uno de los factores más determinantes. La temperatura puede afectar al metabolismo en general y promover o inhibir la actividad enzimática necesaria para que tengan lugar procesos de desarrollo pero no participar específicamente en el EA. Además, la temperatura afecta al estado fisiológico de la planta lo que sí es determinante para su capacidad rizogénica. La principal relación de la temperatura con el enraizamiento se correlaciona con que en los periodos de frío, descienden los niveles de carbohidratos modificando la relación N/C y permitiendo incrementar el enraizamiento. Además la temperatura puede modular el contenido, metabolismo y transporte de auxinas que condicionan el enraizamiento (Geiss *et al.*, 2009).

Aun así algunos trabajos evalúan la temperatura para lograr establecer las condiciones óptimas de EA, como en el trabajo de Correa *et al.* (2012) llevado a cabo en hojas aisladas de *Arabidopsis*. Estos autores demostraron que la temperatura de 20°C era óptima para inducir el enraizamiento, ya que al incrementar la temperatura se inhibía el proceso y temperaturas más bajas reducían el número de raíces, su longitud y retrasaban su emergencia.

Se han descrito mutantes de *Arabidopsis thaliana* sensibles a la temperatura que presentan alteraciones en las diferentes etapas de la formación de RAs. Los mutantes *rid* son deficientes en la etapa de iniciación del proceso, en el mutante *rpd* se bloquea el desarrollo del primordio radicular y los mutantes *rgd* presentan deficiencias en el crecimiento de las raíces. En estos mutantes se ha observado que las células son incapaces de adquirir competencia en la desdiferenciación o continuar el ciclo celular para dividirse, en otros casos es una incapacidad de continuar con la proliferación celular, muestran anomalías en el meristemo apical radicular o presenta requerimientos de auxinas mayores (Konishi y Sugiyama, 2003).

### 5.2. FACTORES ENDÓGENOS

#### 5.2.1. Control hormonal

Las hormonas vegetales son los principales factores endógenos que participan en la integración de estímulos ambientales y la regulación del desarrollo de la planta. Las rutas de señalización hormonal son las encargadas de la percepción y la traducción de la señal en la planta (Benková y Hejácí, 2009). Los distintos procesos de desarrollo, entre ellos el proceso de EA requieren un estricto control del balance hormonal. En general las auxinas y el etileno se describen como promotores y las citoquininas y giberelinas como inhibidores de la

formación de RAs (Pop *et al.*, 2011). Tanto las auxinas como las citoquininas regulan el ciclo celular y la división, por ello en cultivo *in vitro* las auxinas en general se emplean para la inducción de raíces y las citoquininas para el desarrollo del brote (Woodward y Bartel, 2005). En concreto, las auxinas son uno de los factores fundamentales en la inducción del proceso de EA, aunque debemos tener en cuenta que las rutas de señalización auxínica se ven afectadas por las rutas de señalización de otras hormonas. Existe una compleja interacción entre todas las hormonas regulando genes asociados con la biosíntesis, el transporte, el catabolismo y las vías de señalización de otras fitohormonas.

La inducción directa de procesos organogénicos viene determinada por la aplicación exógena de reguladores de crecimiento y su interacción con las fitohormonas endógenas (de Almeida *et al.*, 2012). Estos reguladores de crecimiento también afectan a los niveles de metilación del ADN y de este modo regulan la cascada transcripcional requerida para el correcto desarrollo de la planta (revisado en Valledor *et al.*, 2007). Cuando se induce el EA mediante la sección de un brote se produce una rápida disminución en la concentración de citoquininas, acompañada de la acumulación de auxinas y la biosíntesis de etileno en la región basal, lo que desencadena el proceso de enraizamiento (Geiss *et al.*, 2009).

#### 5.2.1.1. Auxinas

Las auxinas son las hormonas de la planta que participan en el establecimiento del patrón de desarrollo durante la formación de diversos órganos como el embrión, la raíz, las RLs, las hojas, las flores y los frutos. También intervienen en el crecimiento y desarrollo de tejidos, en la elongación del tallo, en el desarrollo del tejido vascular y la caliptra, en el mantenimiento de la dominancia apical, en la diferenciación del meristemo apical de la raíz y en la respuesta a estímulos como el gravitropismo, el fototropismo y la respuesta a estreses (Srivastava, 2002; Woodward y Bartel, 2005; Teale *et al.*, 2006; Konieczny *et al.*, 2009). Además a nivel celular participan en la división, elongación y diferenciación (Swarup y Péret, 2012). La aplicación de auxinas modifica la expresión de cientos de genes en toda la planta, esta respuesta génica es diferente a lo largo del brote en función del tipo de tejido de manera que de forma simultánea desencadena diversas rutas de señalización y varios procesos de desarrollo como por ejemplo estimular la elongación del hipocótilo, suprimir el crecimiento radicular e inducir la iniciación de RLs (Paponov *et al.*, 2008).

El AIA es la auxina más abundante en los tejidos de la planta, aunque también es frecuente el ácido 3-indolbutírico (AIB). En cultivo *in vitro* se observó que la aplicación de auxinas exógenas promueve el desarrollo de RAs a partir de diversos tejidos como callos

indiferenciados (Skoog y Miller, 1957), o a partir de las células del cambium del tejido vascular del brote. La aplicación de estas hormonas genera proliferación celular, dando lugar a la formación de callos indiferenciados y en condiciones óptimas a la inducción de procesos organogénicos y al desarrollo de primordios (Casimiro *et al.*, 2001; Doerner, 2000; Berleth y Sachs, 2001). Para llevar a cabo la inducción de RAs se pueden emplear además de estas auxinas naturales (AIA y AIB), otras auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) frecuentemente empleadas en cultivo *in vitro*. Por ejemplo en *Pinus tadea* la aplicación de ANA es más eficiente que la de AIA (Díaz-Sala *et al.*, 1996). Para llevar a cabo el enraizamiento de brotes axilares en castaño se seleccionó la aplicación de AIB, empleando un tratamiento con 15  $\mu$ M durante 12 días, frente al tratamiento con ANA (Viéitez y Viéitez, 1983). Resultados similares fueron obtenidos en otras especies como *Prunus* y *Eucalyptus* (Fogaça y Fett-Neto, 2005; Štefančič *et al.*, 2005), mientras que en *Cornus mas* y *Symonanthus bancroftii* el ANA proporcionó mejores resultados que la aplicación de AIB (Đurković y Bukovská 2009; Panaia *et al.*, 2000). El efecto de la aplicación de un tratamiento auxínico está determinado por el tipo de auxina, la concentración, el tiempo de exposición y el estado de desarrollo del tejido entre otros factores (Ludwig-Müller *et al.*, 2005). Existen multitud de trabajos que evalúan todo tipo de tratamientos auxínicos con la finalidad de establecer los protocolos óptimos de EA para cada material vegetal. Incluso en especies que no requieren la aplicación exógena de auxinas para desencadenar el proceso de EA, estas pueden ser aplicadas en dosis adecuadas, para mejorar la respuesta rizogénica, incrementar el número de raíces desarrolladas, y sobre todo porque son el factor determinante del porcentaje y el tiempo medio de EA (Geiss *et al.*, 2009; Mauriat *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que altas concentraciones de auxinas estimulan la diferenciación celular y la formación de RLs (Woodward y Bartel, 2005; Li *et al.*, 2009) y que un tratamiento excesivo puede inhibir el proceso de inducción y la elongación, se suelen emplear protocolos en los que tras la inducción auxínica, estas son retiradas para que se desarrollen las raíces (Naija *et al.*, 2008). Los dos tipos de tratamientos más frecuentes consisten en: la aplicación prolongada de bajas concentraciones de auxinas o la aplicación de un pulso corto (entre unos segundos y pocos minutos) con soluciones con una concentración elevada. En castaño y dependiendo del genotipo, la inducción puede llevarse a cabo empleando AIB a altas concentraciones (4,9 mM) aplicadas periodos cortos de tiempo (20-180s) mediante la inmersión basal del brote o “dipping”, concentraciones bajas durante periodos más prolongados (15  $\mu$ M durante 5-7 días) o condiciones intermedias como la

aplicación de AIB 125  $\mu$ M durante 24 horas (Viéitez y Viéitez, 1983; Viéitez *et al.*, 1989, 2007).

El AIB suele actuar como precursor de AIA ya que mediante  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma se convierte en AIA (Baque *et al.*, 2010; Pop *et al.*, 2011), aunque también desempeña diversas funciones sin necesidad de ser transformado o modula la actividad de AIA (Woodward y Bartel, 2005; Ludwig-Müller *et al.*, 2005). A pesar de ello, en muchas especies forestales suele emplearse el AIB, por ser más efectivo que el AIA (Chhun *et al.*, 2004), esto se debe a que es más activo a bajas concentraciones, su metabolismo es diferente y lo convierte en moléculas más estables ante el estrés oxidativo en los tejidos de la planta (Nordström *et al.*, 1991). Además, ambos compuestos emplean vías de transporte diferentes y en las raíces existe un transporte mucho mayor de AIB (Rashotte *et al.*, 2003).

Se han identificado compuestos derivados de la urea que actúan como adyuvantes de las auxinas (Ricci *et al.*, 2008; Brunoni *et al.*, 2014). Estos autores demostraron que estos compuestos promueven el enraizamiento en *Arabidopsis*, manzano y pino. Se cree que aumentan la concentración de auxinas afectando a su influjo o su transporte en general, también participan en la localización específica de las auxinas generando puntos máximos de concentración en zonas específicas donde se promueve la proliferación celular y la organización del primordio radicular y aumentan la sensibilidad celular a la presencia de auxinas, aunque no modifican su competencia para la formación de raíces. Además el efecto positivo de estos compuestos en el EA se correlaciona con niveles altos de transcritos de genes inducibles por auxina e involucrados en el proceso, como el *PrSCL1*. Otros compuestos que pueden actuar como adyuvantes son moléculas de señalización bacteriana como N-acilhomoserinalactonas. Las plantas son capaces de percibir estas señales y cambiar el patrón de expresión génica afectando al crecimiento y desarrollo de la raíz, incrementando la producción de peróxido de hidrogeno, óxido nítrico y el transporte basipétalo de auxinas para incrementar la formación de RAs (Bai *et al.*, 2012).

En el control de las vías de señalización auxínica se puede actuar a cuatro niveles diferentes: en las rutas de biosíntesis, regulando la actividad y el catabolismo mediante la conjugación de auxinas, en las vías de transporte y finalmente en la transducción de la señal (Rozov *et al.*, 2013).

#### ➤ Conjugación y metabolismo de auxinas

El porcentaje de AIA libre en las células suele ser muy bajo, lo normal es que aparezca conjugado con azúcares, péptidos y sobre todo aminoácidos. La conjugación de auxinas



regula la homeostasis y su actividad en los tejidos. En este proceso de conjugación participan principalmente dos familias de proteínas; las uridinadifosfato (UDP) -Glicosiltransferasas (UGT) que catalizan la unión de azúcares mediante enlaces glucosílicos, y las Gretchen Hagen 3 (GH3), que catalizan la conjugación de auxinas con diversos aminoácidos (Westfall *et al.*, 2010). En monocotiledóneas es más frecuente la glicosilación de auxinas y en dicotiledóneas suelen actuar las proteínas GH3, formando conjugados a péptidos o aminoácidos (Rozov *et al.*, 2013). Estos conjugados participan en el almacenamiento, transporte, compartimentación, detoxificación del exceso de AIA y en la protección contra la degradación peroxidativa. En *Arabidopsis* la UGT84B1 participa en la conjugación de AIA y UGT74E2 en la conjugación de AIB (Tognetti *et al.*, 2010; Ludwig-Müller, 2011). Otros genes involucrados en la glicosilación de auxinas que pueden regular el balance entre AIB y AIA son el UGT74E2, el UGT75B1 y el UGT75B2 (revisado en Schnaubelt *et al.*, 2015). Las enzimas GH3, se clasifican en tres grupos en función del sustrato específico que emplean, entre ellas las del grupo II se caracterizan por ser inducibles por auxinas y catalizar la síntesis de conjugados de AIA a diversos aminoácidos: AIA-Leu, AIA-Ala y AIA-Phe parece que actúan como sustitutos del AIA libre y pueden ser hidrolizados a AIA libre (Staswick *et al.*, 2005). Del mismo modo que el AIA libre, estos conjugados son capaces de inhibir la elongación de las raíces de *Arabidopsis*. Los conjugados de AIA-Asp y AIA-Glu no muestran actividad auxínica, actúan como precursores de las vías de catabolismo y AIA-Trp es un inhibidor de la actividad enzimática e inhibidor del crecimiento (Woodward y Bartel, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Ludwig-Müller, 2011).

Las peroxidasas son enzimas con acción catalítica de diversos compuestos orgánicos incluido el AIA (Correa *et al.*, 2012). La actividad peroxidasa y los compuestos fenólicos pueden jugar un papel importante en el catabolismo de auxinas en las primeras etapas de inducción del EA (da Costa *et al.*, 2013). Frecuentemente, durante la iniciación del EA, baja la concentración de auxinas y compuestos fenólicos y se incrementa la actividad peroxidasa.

#### ➤ *El transporte polar de auxinas*

La distribución apropiada de auxinas es necesaria en diversos procesos de desarrollo como la embriogénesis, la floración, el desarrollo de RLs, el desarrollo del sistema vascular, la elongación de la raíz y la respuesta al gravitropismo (Reed *et al.*, 1998). El AIA es sintetizado mayoritariamente en el ápice del brote aunque también en el ápice radicular y otras zonas con carácter meristemático del organismo (Ljung *et al.*, 2005), pero no se acumula allí sino que se transporta y ejerce su acción en otros puntos de la planta. Existe un transporte a través del floema sin necesidad de gasto de energía (Swarup y Péret, 2012), pero para que

tenga lugar el desarrollo normal de la planta es necesario el establecimiento de un gradiente de auxinas que se genera gracias al transporte polar de auxinas (TPA) con gasto de energía. El TPA puede ir en dos direcciones (Reed *et al.*, 1998; Woodward y Bartel, 2005):

- **Basipétalo:** En los brotes las auxinas son sintetizadas en el ápice caulinar y las hojas jóvenes y son transportadas hacia la raíz. En la raíz, a través de las células del córtex y la epidermis son transportadas desde el ápice a la zona de elongación, este transporte es necesario tanto para el crecimiento como para el gravitropismo de la raíz y en la iniciación de RLs (Casimiro *et al.*, 2001).
- **Acropétalo:** En la raíz las auxinas son transportadas a través del cilindro vascular y el protofloema hacia el ápice radicular, este transporte es necesario para la emergencia y desarrollo de nuevas RLs (Casimiro *et al.*, 2001).

El TPA en ambas direcciones a través de dos flujos completamente separados espacialmente en la raíz es fundamental para la estructuración del meristemo radicular. En él participan una serie de proteínas transportadoras que se distribuyen en la célula y los tejidos para modular la acumulación hormonal (Delker *et al.*, 2008). Para que se establezca el gradiente de auxinas tras su aplicación se induce la expresión de estas proteínas transportadoras tanto de influjo como eflujo (Paponov *et al.*, 2008). Las proteínas AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) y Like-AUX (LAX) son permeasas encargadas de introducir la hormona en la célula por lo que se localiza de forma polarizada recibiendo el flujo de llegada de auxina (Blakeslee *et al.*, 2005). Las proteínas PIN y “ATP-BINDING CASSETTE TYPE B / P-GLYCOPROTEIN / MULTIDRUG RESISTANT (ABCB/PGP/MDR) se distribuyen de forma asimétrica en la célula para determinar la dirección del flujo de salida de la hormona (Blakeslee *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2007; Konieczny *et al.*, 2009). Estas proteínas actúan de forma conjunta y aunque las proteínas PIN se consideran los principales transportadores del eflujo, su distribución y estabilidad se ve afectada por la formación de complejos con ABCB/PGP/MDR (Zažimalová *et al.*, 2010). Sin embargo existen excepciones como el transportador PGP4 que además parece participar en el influjo, redireccionando las auxinas en el ápice de la raíz (Swarup y Péret, 2012). La distribución de estos transportadores es de gran relevancia ya que la auxina puede entrar en la célula por difusión simple, a favor de un gradiente de pH, pero no es capaz de salir, por lo que son estas proteínas transportadoras las que determinan la distribución, el establecimiento del gradiente hormonal en los tejidos y generan puntos de concentración máximos lo que marca el lugar donde se formará un nuevo órgano (Benková *et al.*, 2003; Woodward y Bartel, 2005). La formación de puntos máximos de concentración de auxinas genera la desdiferenciación de las células, dando lugar al cambio



en el patrón de expresión génica y desencadenando el programa de formación del nuevo órgano, como ocurre en la formación de RAs y RLs. En la formación de RLs este incremento de la concentración no se debe a la inhibición de las proteínas PIN sino a un cambio dinámico de la ubicación polar de la proteína PIN1 en la membrana plasmática. Cualquier alteración de estas proteínas transportadoras ocasiona defectos en la arquitectura del brote y las raíces (Zheng *et al.*, 2011).

Existen diversos trabajos en los que se evaluó el papel de algunas proteínas concretas de estas familias en el crecimiento y desarrollo de la raíz. Por ejemplo AUX1 juega un papel importante en la respuesta gravitrópica de la raíz. La actuación conjunta de AUX1 y LAX3 está implicada en el desarrollo de RLs generando puntos máximos de auxinas en las células del periciclo que van a iniciar el desarrollo del primordio (Swarup y Péret, 2012); además LAX3 participa en la emergencia de las RLs (Swarup *et al.*, 2008; Swarup y Péret, 2012). En la formación de RAs, LAX1 interviene en la generación de los puntos máximos de auxinas y LAX3 es requerido para definir y mantener el máximo de auxinas del ápice de la raíz y en el control de los niveles de auxinas/citoquininas durante el desarrollo de las RAs (Della Rovere *et al.*, 2015).

Las proteínas transportadoras PIN son específicas de plantas y muy diferentes a otras proteínas transportadoras de otros grupos de organismos. Cada miembro de la familia PIN presenta un patrón de expresión específico asociado a ciertos tejidos y puede estar implicado en diversos procesos (Blakeslee *et al.*, 2005; Swarup y Péret, 2012). La distribución específica de las proteínas PIN genera los gradientes de auxinas en puntos concretos para la formación de nuevos meristemas u órganos. De este modo PIN1 es esencial para el transporte basipétalo en el brote y acropétalo de la raíz a través del parénquima xilemático. PIN1 y PIN7 participan en el transporte basipétalo durante el desarrollo del embrión, PIN1 y PIN2 en el flujo polar que dirige la organogénesis (Benková *et al.*, 2003) y PIN2 en el flujo basipétalo de la raíz desde el meristemo (Chen *et al.*, 2012). Además, podemos asociar cada proteína de la familia PIN con un tejido concreto: PIN1 en el tejido vascular maduro, PIN2 en la epidermis de la raíz y PIN3 en la reorientación lateral de las auxinas en el ápice de la raíz en respuesta al gravitropismo (revisado en Zažímalová *et al.*, 2010). Las proteínas PIN pueden reorganizarse rápidamente y cambiar su distribución celular para responder a estímulos ambientales. Además existen proteínas PIN localizadas en las endomembranas celulares, como PIN5 presente en el retículo endoplasmático, por lo que también regulan la homeostasis celular de auxinas exponiéndolas a enzimas de conjugación o degradación (Zažímalová *et al.*, 2010).

A lo largo del desarrollo de las RAs y RLs va cambiando la actividad de las proteínas transportadoras de forma coordinada, y por todo esto, la alteración del transporte afecta a la iniciación y elongación de la raíz, la formación de RLs y la respuesta gravitrópica (Geldner *et al.*, 2004). Además son muchos los factores endógenos y exógenos que regulan el TPA y las proteínas transportadoras implicadas. Entre ellos los flavonoides alteran la expresión de proteínas PIN en respuesta a herbivoría o estrés oxidativo (Woodward y Bartel, 2005; Zažímalová *et al.*, 2010).

Estudios recientes parecen indicar que las vías de transporte del AIA, AIB y 2,4D son diferentes (Bellini *et al.*, 2014). Por ejemplo AUX1, PIN2, PIN7, ABCB1 y ABCB19 participan en el transporte de AIA pero no de AIB (Strader y Bartel, 2009). Las proteínas PDR (pleiotropic drug resistances) son proteínas transportadoras de membrana que forman complejos con las proteínas PEN3 (Penetration3) y ABCG36 (ATP-Binding Cassette Type G 36) para responder a infecciones de patógenos, transportar cadmio y a través de mutantes *pdr8* se ha observado que dirigen el eflujo de AIB contribuyendo a la homeostasis de auxinas (Strader y Bartel, 2009).

#### ➤ *Inhibición del transporte auxínico*

Existen varios compuestos sintéticos y de origen natural que inhiben el TPA. El grupo más estudiado son las fitotropinas, que inhiben la respuesta al gravitropismo, el fototropismo y el transporte de auxinas. El ácido N-1-naftil-ptalámico (NPA) es la fitotropina más empleada en los estudios de señalización auxínica, a pesar de que existen otros compuestos sintéticos más activos (Luschnig, 2001). Los inhibidores del transporte de auxinas pueden actuar sobre los canales de influjo como el ácido naftoxiacético y el ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético (Blakeslee *et al.*, 2005) o sobre los canales de eflujo como el NPA o el ácido triiodo-benzoico (TIBA) (Konieczny *et al.*, 2009). El uso de inhibidores del transporte auxínico ha ayudado a demostrar que dicho transporte es crucial para la formación de RLs (Reed *et al.*, 1998) y RAs (Sukumar *et al.*, 2013).

El TIBA inhibe el eflujo de auxinas actuando sobre las proteínas PIN1 (Woodward y Bartel, 2005). Este compuesto es un como inhibidor competitivo del transporte de auxinas y suprime la actividad del AIA actuando de forma antagonista (Paponov *et al.*, 2008; Konieczny *et al.*, 2009; Swarup y Péret, 2012). Sin embargo, el NPA genera la deslocalización de las proteínas PIN1, debido a las proteínas de unión a NPA (NBP) que actúan sobre el citoesqueleto (Muday y DeLong, 2001) y las proteínas MDR/PGP con las que presenta alta afinidad (Kerr y Bennett, 2007). Se ha caracterizado un mutante resistente a la acción del NPA “roots curl in NPA” (*rcn1*) que incrementó el transporte basipétalo de auxinas

gracias a la reducción de la actividad de la proteína fosfatasa 2A (Rashotte *et al.*, 2001). Por todo esto se ha comprobado que el NPA provoca la inhibición y/o el retraso del enraizamiento y la reducción en el número y densidad de RLs y RAs (Konieczny *et al.*, 2009) lo que confirma la implicación del TPA en estos procesos. El bloqueo del flujo de auxinas, tanto del transporte basipétalo como acropétalo de la raíz, generado por el NPA, evita la formación de máximos de auxinas, bloqueando el desarrollo de las primeras divisiones periclinares que marcan el comienzo de la formación de las RLs (Casimiro *et al.*, 2001).

Muchos de los mutantes que presentan alteraciones en la respuesta auxínica también muestran modificaciones de otras rutas de señalización hormonales y en la respuesta a diversos estímulos como a la luz o el gravitropismo (Rashotte *et al.*, 2000; Teale *et al.*, 2006). Un efecto similar se observa con la aplicación de inhibidores del TPA, sin embargo el NPA no afectó a la concentración de citoquininas, por lo que su efecto inhibitorio en el enraizamiento no se genera por la acumulación de citoquininas (Koukourikou-Petridou y Bangerth, 1997).

El TPA puede llevarse a cabo también por proteínas transportadores de otras moléculas como transportadores de nitrato; u otros compuestos pueden competir por las rutas de transporte auxínicas como el malato que emplea las proteínas ABCB14 (Zažímalová *et al.*, 2010).

➤ *Control a nivel transcripcional de la señalización auxínica.*

Para que se traduzca la señal auxínica a las células diana es necesaria la presencia de proteínas receptoras. Se han descrito dos tipos de receptores de auxinas; los receptores TIR (Transport Inhibitor Response) y las proteínas ABP1 (Auxin-Binding Protein1) (da Costa *et al.*, 2013).

Las ABP1 localizadas en la membrana plasmática, son el primer sensor de concentración de auxina extracelular que regula su transporte, constituyen la vía de comunicación entre estímulos extracelulares y el citosol. Su unión a auxinas inhibe la endocitosis de las proteínas PIN, por lo que las ABP1s regulan el transporte de auxinas en la planta. Muchos trabajos la han descrito como un receptor de auxina que regula su respuesta, pero no transcripcionalmente sino induciendo cambios rápidos en la membrana celular y el citosol (Robert *et al.*, 2010; Scherer, 2011; Shi y Yang, 2011), sin embargo sí se han observado alteraciones transcripcionales de genes de respuesta a auxinas en mutantes de este gen (Grones y Friml, 2015). Con bajas concentraciones de auxinas, ABP1 reduce el flujo de auxinas y promueve la endocitosis de PIN; por el contrario cuando las concentración de

auxinas es elevada ABP1 inhibe la endocitosis y estimula el eflujo (Nagawa *et al.*, 2012; Čovanová *et al.*, 2013). En presencia de auxina, las proteínas ABP1 interactúan con receptores tipo quinasa (RLK), los cuales traducen la señal auxínica al interior de la célula mediante fosforilación (Dai *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). ABP1 está involucrada en la respuesta temprana de crecimiento celular y es fundamental en el control del ciclo celular, ya que sin ella se altera la orientación de los planos de división (Tromas *et al.*, 2010). La total pérdida de actividad de ABP1 en mutantes de *Arabidopsis thaliana* confiere letalidad a los embriones, lo que refleja que es esencial para el desarrollo de la planta (Teale *et al.*, 2006).

Intracelularmente la auxina se une a receptores TIR1/AFBs (transport inhibitor response 1/Auxin signalling F-Box proteins) y actúan en el núcleo induciendo la degradación de proteínas Aux/AIA (Auxina/ácido indolacético) impidiendo que se unan a las ARF y permitiendo que se active la señalización auxínica (Mockaitis y Estelle, 2008; Ludwig-Müller, 2011; Rozov *et al.*, 2013). Las ARF son factores de transcripción que inician la cascada de señalización auxínica promoviendo la transcripción de genes de respuesta a auxinas como los *GH3*. Estas proteínas son los verdaderos reguladores de la señalización auxínica a nivel transcripcional. En *Arabidopsis* se han descrito 6 miembros de esta familia génica (TIR1, AFB1, AFB2, AFB3, AFB4 y AFB5); todos ellos se unen a las auxinas y a las Aux/AIA con diferente afinidad (Rahman *et al.*, 2007; Mockaitis y Estelle, 2008). Los complejos TIR1-AIA provocan la poliubiquitinación de las proteínas Aux/AIA lo que genera su catabolismo (Quint y Gray, 2006). El patrón de expresión de las TIR/AFB no se ve afectado por la concentración de auxinas. Además ciertas proteínas TIR, como TIR3 están implicadas en el transporte de auxinas y se pueden unir a inhibidores del transporte activo de auxinas, como al NPA, se cree que TIR3 codifica para las proteínas NBP regulando la distribución de las proteínas PIN (Muday y Murphy, 2002; Blakeslee *et al.*, 2005). Estas proteínas también intervienen en la integración y el control de las diferentes vías de señalización hormonal. Mutantes deficientes en proteínas TIR, presentan alteraciones en la transmisión de la señal auxínica lo que se manifiesta en cambios en la elongación del hipocótilo (revisado en Rozov *et al.*, 2013) y en una pérdida de la capacidad de formación de RLs (Ruegger *et al.*, 1998). Además, muestran cambios de sensibilidad a otras hormonas como citoquininas, ABA o etileno (revisado en Benková y Hejátko, 2009), mientras que las proteínas F-Box están involucradas en la respuesta del ácido jasmónico y de las giberelinas (Teale *et al.*, 2006).

Durante el enraizamiento se ha observado que el gen *TIR1* se expresa en las etapas iniciales de formación de primordios de RLs antes de que se inicien las divisiones celulares

del periciclo (Casson y Lindsey, 2003). En *E. grandis* el incremento de la expresión de *TIR1* y *ABP1* en plantas control durante la fase de inducción del EA, puede indicar una percepción activa de los niveles de auxina endógena para promover la transcripción de genes de respuesta a auxinas y de pared celular, modificaciones necesarias para que se desarrolle el enraizamiento (de Almeida *et al.*, 2015).

#### 5.2.1.2. Citoquininas

Las citoquininas regulan el crecimiento y desarrollo de la planta participando en el control del ciclo celular, el desarrollo vascular, la diferenciación de los cloroplastos, la dominancia apical y la senescencia siempre mediante su interacción con otros factores como la luz, el etileno y las auxinas (Rashotte *et al.*, 2005). La relación de citoquininas:auxinas determina el proceso organogénico que se desencadena en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ya sea a partir de diferentes órganos o callos indiferenciados (Skoog, 1944). Esto se debe a que esta relación controla muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta: división, diferenciación y elongación celular, la determinación de los planos de división, la polaridad celular y la determinación de la morfología de órganos y tejidos (Zheng *et al.*, 2011), incluyendo el desarrollo de raíces y brotes (Paponov *et al.*, 2008; Bishopp *et al.*, 2011). En el desarrollo de la raíz regulan su morfogénesis controlando el meristemo radicular y el crecimiento de la raíz. Durante el proceso de enraizamiento, al igual que ocurría con las auxinas, se modifica su concentración, descendiendo durante la inducción y activación y aumentando durante el desarrollo y la emergencia (Kevers *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 2015). Aunque en la fase de inducción de RLs y RAs las citoquininas tienen un claro efecto inhibitorio, en algunos casos la aplicación de bajas concentraciones puede mejorar la respuesta auxínica en el EA (Van Staden y Harty, 1988) participando positivamente en otras etapas del desarrollo radicular, promoviendo su elongación (E *et al.*, 2012). Para la proliferación de raíces, la producción de biomasa radicular y de metabolitos secundarios en las raíces, es frecuente incluir citoquininas en el medio de cultivo tras la fase de inducción (Lee *et al.*, 2011). Existe una relación inversa entre el contenido en citoquininas y la capacidad rizogénica en diversos clones de castaño (Vidal *et al.*, 1994), así como en otras especies como el sauce (Grönroos *et al.*, 1989) y chopo (Okoro y Grace, 1978).

Para que tenga lugar la inducción del EA es importante que exista un alto ratio AIA/citoquininas (Vidal *et al.*, 1994). A través del balance entre auxinas y citoquininas la planta regula importantes aspectos del desarrollo de la raíz, la especificación del nicho de células madre de la raíz durante la embriogénesis y el establecimiento y mantenimiento del CQ (Konieczny *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011). Por ello, las rutas de biosíntesis de auxinas



están controladas por las citoquininas y viceversa (Konieczny *et al.*, 2009). Un incremento en la concentración de auxinas reduce la síntesis de citoquininas y contribuye a su degradación (Nordström *et al.*, 2004). Las citoquininas activan ciertos factores de transcripción que inhiben las rutas de señalización auxínica y regulan el TPA y el establecimiento del gradiente local de auxinas, mediante la regulación de la expresión de las proteínas PIN (Benková y Hejácíko, 2009). Son las proteínas “auxin up-regulated F-box” (AUF), que inhiben la sensibilidad y la expresión de genes de la ruta de señalización de la citoquininas y controlan la expresión de diversas proteínas de la familia PIN (Zheng *et al.*, 2011). Además, estos autores describieron el mutante *auf1*, el cual no está afectado por la aplicación exógena de auxinas y sin embargo mostró alteraciones tras la aplicación de NPA y TIBA, potenciando su efecto en la reducción del transporte acropétalo y basipétalo de auxinas en la raíz. Las auxinas inducen la expresión rápida y transitoria de las proteínas AUF1 que a su vez afectan a la abundancia y/o actividad de otros reguladores, positivos o negativos, asociados con la señalización de las citoquininas, incluidos los efectores del TPA mediados por etileno.

La zeatina ribosa, presente en el xilema, es una de los principales supresores de la formación de RAs (Kuroha y Satoh, 2007). Su efecto inhibitorio tiene lugar mediante el control de la expresión de ciertos genes de la ruta de señalización hormonal auxínica, por ejemplo inhibe la expresión de ciertas proteínas PIN en la raíz limitando la formación de puntos máximos de auxinas y con ello la inducción de la división celular (Zheng *et al.*, 2011). La kinetina también inhibe la respuesta rizogénica aumentando la producción de etileno, el cual actúa sobre el TPA. A nivel transcripcional también las citoquininas inhiben factores de transcripción inducibles por auxinas.

#### **5.2.1.3. Giberelinas**

Las giberelinas son hormonas de plantas que regulan su crecimiento y desarrollo en respuesta a las variaciones ambientales (Olszewski *et al.*, 2002). Participan en diferentes procesos, como la germinación de las semillas, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la maduración del polen y la inducción de la floración (Davière y Achard, 2013). En general se asocian con el crecimiento secundario del brote, sobre todo promueven el crecimiento en longitud de los brotes, participan en la dominancia apical e inhibe el proceso de enraizamiento. La aplicación exógena de ácido giberélico (AG) promueve el crecimiento en altura de los brotes, mientras que dicho crecimiento se reprime mediante la inhibición de su biosíntesis (revisado en Farquharson, 2010). Se han identificado una gran variedad de giberelinas en la naturaleza pero la mayoría de ellas no son bioactivas, actúan como precursores de las formas bioactivas que son AG1, AG3, AG4 y AG7.

Se han atribuido diversos papeles a las giberelinas en el desarrollo radicular, su función se ha asociado con la elongación de la raíz primaria, la expansión celular de la zona de elongación y la organización del centro de desarrollo de la raíz (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). El efecto de las giberelinas puede variar a lo largo de las diferentes etapas de enraizamiento, se cree que inhibiendo la inducción y promoviendo el desarrollo de raíces. Se ha observado que las giberelinas inhiben el número de RLs y el crecimiento de la raíz además de inhibir el EA en *Populus* (Busov *et al.*, 2006). El análisis de diversos mutantes deficientes en giberelinas, han puesto de manifiesto la implicación del mismo en el crecimiento radicular. Su efecto está muy asociado a tejidos concretos, como la endodermis que es el primer tejido que responde a las giberelinas (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008), y es a través de la regulación del crecimiento de la endodermis que se limita la elongación del resto de tejidos y de la raíz. Aunque principalmente se ha estudiado el gradiente de auxinas en el crecimiento de la planta, este también viene determinado por la distribución no uniforme de otras hormonas como las giberelinas (revisado en Band *et al.*, 2012). La compleja dinámica que regula la distribución de giberelinas, dirige diversos procesos de desarrollo como la germinación, el desarrollo de los órganos florales entre otros, la determinación de la forma y el tamaño de las hojas, la expansión del xilema y el crecimiento de tallos y raíces (revisado en Band *et al.*, 2012; Middleton *et al.*, 2012). Band *et al.* (2012) propusieron un modelo matemático que explica el crecimiento radicular a través de la creación de un gradiente en la concentración de giberelinas, lo que delimita la concentración de proteínas DELLA (GAI, Giberellin-Acid Insensitive y RGA, Repressor of Giberellin) que reducen la elongación celular, lo que explica la reducción del crecimiento que se exhibe en la zona de elongación. Las giberelinas regulan la división y elongación celular mediante la desestabilización de las proteínas DELLA, factores de transcripción de la familia GRAS, que actúan como inhibidores del crecimiento, ya que bloquean la capacidad de unión de muchos factores de transcripción al ADN (Davière y Achard, 2013). Las giberelinas se unen a las proteínas receptoras GID (Gibberellin Insensitive Dwarf), este complejo produce la poliubiquitinación de las proteínas DELLA induciendo su degradación en el proteosoma 26S (Richards *et al.*, 2001; Benková y Hejátko, 2009; Band *et al.*, 2012; Middleton *et al.*, 2012).

Existe una importante interacción entre las giberelinas y el resto de hormonas. El análisis transcriptómico realizado en raíces de dos líneas transgénicas de chopo, una deficiente y otra insensible a las giberelinas, reveló que la mayoría de los genes en los que se alteraba su expresión eran los de respuesta a estímulos hormonales, lo que sugiere una importante interrelación de las giberelinas con otras hormonas (Gou *et al.*, 2010). Además, en este

análisis se detectó la inducción de genes implicados en la proliferación celular y la regulación del ciclo celular como los genes *SCARECROW*, y la inhibición de tres *UGTs* (Gou *et al.*, 2010). Esta alteración de las vías de señalización hormonal y del contenido en fitohormonas es específica de cada tejido. El efecto positivo de las giberelinas en la elongación radicular va asociado a las auxinas, sin embargo en presencia de citoquininas su efecto es antagónico. Las auxinas promueven el crecimiento de la raíz a través de las giberelinas, el gen *RGA* actúa integrando la señal de auxinas y giberelinas (Benková y Hejátko, 2009; Mauriat *et al.*, 2011). El etileno también inhibe la elongación de la raíz a través de las proteínas DELLA ya que en la expansión de las células de la endodermis actúa *GAI* (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). En general la aplicación de auxina reduce los niveles de giberelinas, aunque su biosíntesis requiere de la presencia de auxinas y de su transporte basipétalo, pero la respuesta es dependiente de la concentración de auxinas, el tiempo de aplicación y el tipo de tejidos (Woodward y Bartel, 2005; Paponov *et al.*, 2008). Además, las giberelinas reprimen el efecto inhibitor del crecimiento de la raíz generado por el etileno. Las giberelinas inhiben la inducción del EA, no a través de la alteración de la ruta de señalización auxínica sino mediante la alteración de su TPA (Mauriat *et al.*, 2014). En *Populus* se altera el eflujo y en *Arabidopsis* tanto el influjo como el eflujo del TPA. Este tipo de interacción también se observa en otros procesos como el desarrollo de yemas axilares que se promueve por las giberelinas, sin embargo la dominancia apical depende de auxinas y citoquininas. La señalización de las giberelinas controla la expresión de multitud de genes implicados en diferentes vías del ABA, etileno, auxinas y estrés abiótico, siendo las proteínas DELLA las que actúan de punto de interrelación (Gou *et al.*, 2010; Davière y Achard, 2013).

➤ *Inhibición de la ruta de biosíntesis de las giberelinas.*

La ruta de síntesis de las giberelinas puede dividirse en tres etapas y cada una de ellas puede ser bloqueada por diversos inhibidores, alterando el crecimiento de brotes y raíces de forma diferente. En la primera etapa tiene lugar la ciclación de la molécula, este proceso puede ser inhibido por la aplicación de compuestos como el cloruro de clomequat y el cloruro de mepiquat. El paclobutrazol (PAC) actúa sobre la segunda etapa inhibiendo el proceso oxidativo por el que el ent-kaureno se convierte en ácido ent-kaurenoico. La tercera etapa se inhibe mediante acilciclohexanedione, como por ejemplo la prohexadiona cálcica; la aplicación de este compuesto inhibe el crecimiento del brote y fomenta la formación de nuevas raíces, pero inhibe su crecimiento ya que inhibe las divisiones y la elongación celular (Gaspar *et al.*, 1996; Žiauka y Kuusiene, 2010). Estos compuestos se emplean en el estudio de las rutas de señalización de las giberelinas pero también es frecuente utilizarlos en horticultura



ya que regulan el crecimiento y permiten obtener plantas más pequeñas y vigorosas, que suelen mostrar mejores rendimientos en el proceso de aclimatación, y entre otras cosas promueve el desarrollo del sistema radicular, sobre todo a bajas concentraciones (Yelenosky *et al.*, 1993; Ubeda-Tomás *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2013).

#### 5.2.1.4. Etileno

El etileno y ABA son las principales hormonas vegetales implicadas en la respuesta a estrés y se asocian con la capacidad de respuesta a estímulos ambientales mediante la interacción con el resto de rutas de señalización hormonal. Se ha observado que el etileno interrumpe la dominancia apical disminuyendo la relación auxinas:citoquininas, incrementa la biosíntesis y sensibilidad a las giberelinas y promueve la degradación de ABA y la reducción de su biosíntesis (Žiauka y Kuusiene, 2010). En el proceso de EA puede tener efecto inhibidor, promotor o neutro en función de la especie (Geiss *et al.*, 2009; Trupiano *et al.*, 2013). En *Populus* juega un papel negativo en la formación de RAs, sin embargo, en general la acumulación de etileno en la zona basal del brote promueve el EA pero en la zona apical lo inhibe (Li *et al.*, 2009). El etileno promueve el EA durante la desdiferenciación, aunque altas concentraciones de ANA promueven la síntesis de etileno hasta concentraciones que lo convierten en inhibidor. McDonald y Visser (2003) sugirieron que el desarrollo de RAs tiene lugar por la interacción entre el etileno y las auxinas. En suelos anegados se produce un aumento en la concentración de etileno que incrementa la sensibilidad de los tejidos a las auxinas lo que induce el desarrollo de RAs (Visser *et al.*, 1996). Por el contrario, la insensibilidad al etileno reduce la formación de RAs (Clark *et al.*, 1999). Aunque el etileno no induce el EA es necesario para que tenga lugar la inducción auxínica (Lima *et al.*, 2009) como se confirmó en el trabajo de Harbage y Stimart (1996a), en el que se observó que la aplicación de NPA inhibía el TPA e incrementaba la concentración de etileno sin promover la inducción del EA. Los puntos máximos de auxinas tienen lugar en presencia de etileno (Vandenbussche *et al.*, 2010). Algunos autores formularon como hipótesis de la iniciación de RLs y RAs que el etileno es el primer factor que interrumpe el TPA, lo que genera un punto de máxima acumulación de dicha hormona y esto induce la formación de la raíz (Konieczny *et al.*, 2009).

La regulación de auxinas y etileno es bidireccional, el incremento en la concentración de etileno en los tejidos incrementa su sensibilidad al AIA promoviendo la formación de raíces (Visser *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1999; McDonald y Visser, 2003). Por otra parte, la respuesta al etileno se ve mediada por las auxinas, es necesario el eflujo de auxinas para que exista respuesta a los tratamientos con etileno (Vandenbussche *et al.*, 2010). El estudio con mutantes de la cascada de señalización auxínica como la biosíntesis, el transporte, los receptores y la

traducción de la señal, mostró que la inhibición de las auxinas también produce insensibilidad al etileno (Benková y Hejácíko, 2009). Algunos *ERFs* (“ethylene response factors”) afectan a la respuesta auxínica. En general, la sobreexpresión de *ERFs* generada por la aplicación de auxinas genera una mayor sensibilidad de la planta al etileno (Paponov *et al.*, 2008). El bloqueo del etileno inhibe el enraizamiento en presencia de AIA pero no inhibe la proliferación celular, lo que da lugar a la formación de callo (Konieczny *et al.*, 2009). Tras la inducción del EA en *Populus* mediante escisión, se inducen la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de etileno en las primeras 48 horas (revisado en Abu-Abied *et al.*, 2012). Mutantes con insensibilidad a la presencia de etileno muestran reducción del número de raíces al igual que ocurre cuando se aplica NPA (McDonald y Visser, 2003). El etileno controla la transcripción de muchos de los genes de la ruta de biosíntesis y transporte auxínico, además de inducir la expresión de genes de respuesta a auxinas como el *ARF7* (Vandenbussche *et al.*, 2010). Sin embargo actúa negativamente sobre los niveles de *ARFs* a través de las proteínas Hookless1 (Woodward y Bartel, 2005). También controla el TPA mediante la inducción de la expresión de genes *PIN* y *AUX1*, regulando la distribución de las proteínas AUX1 en la zona de elongación de la raíz (Konieczny *et al.*, 2009) e inhibe el transporte lateral y basipétalo de auxinas (Woodward y Bartel, 2005). El etileno participa en el crecimiento de la raíz regulando la ruta de señalización auxínica (Růžicka *et al.*, 2007; Cederholm *et al.*, 2012), de forma que inhibe la elongación de las raíces (McDonald y Visser, 2003) pero estimula el desarrollo de pelos radiculares (Patrick *et al.*, 2009). También se considera al etileno como el principal factor que facilita la emergencia de los primordios radiculares (Vidoz *et al.*, 2010; Steffens *et al.*, 2012). Además participa en el mantenimiento del CQ de la raíz, regulando las divisiones celulares e interviene en el crecimiento de la raíz inhibiendo la rápida expansión celular del meristemo radicular (McDonald y Visser, 2003). En el ápice de *Arabidopsis* el tratamiento con etileno incrementa la acumulación de auxinas, debido a que induce la biosíntesis de auxinas y controla su influjo mediante las proteínas AUX1 (Vandenbussche *et al.*, 2010). El etileno promueve las divisiones celulares en el CQ, lo que sugiere que las auxinas no son capaces de actuar por sí solas (da Costa *et al.*, 2013).

La aplicación exógena de auxinas estimula la producción de etileno mediante la inducción de la expresión de los genes *ACSs* (1-amino-ciclopropano-1-carboxilato sintasa), implicados en la etapa limitante de su biosíntesis (Yamagami *et al.*, 2003); entre ellos la ACC oxidasa (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa) que cataliza el último paso del proceso de biosíntesis de etileno y la N-acetiltransferasa factor clave en la integración de la vía de señalización auxinas-etileno (Lehman *et al.*, 1996). Además, se requiere de la acción

conjunta con las citoquininas, que tienen un efecto sinérgico con las auxinas, ya que estabilizan las proteínas ACSs (Rashotte *et al.*, 2005). Las auxinas promueven la producción de etileno y el etileno modula la biosíntesis y transporte de auxinas regulando el desarrollo de las raíces y en función de la etapa del proceso y además el efecto de los reguladores de etileno depende de la concentración de auxinas aplicada (De Klerk y Hanecakova, 2008).

El etileno también participa en el desarrollo radicular mediante la interrelación con otras hormonas. Se ha observado que las citoquininas estimulan la producción de etileno, por lo que se cree que el efecto generado por las citoquininas en el crecimiento de la raíz está mediado por el etileno (Benková y Hejátko, 2009). Citoquininas y auxinas estimulan la biosíntesis de etileno, principalmente cuando son aplicadas de forma conjunta (Konieczny *et al.*, 2009). El etileno también puede promover el enraizamiento activando el catabolismo de citoquininas (revisado en Li *et al.*, 2009). De forma antagonista a las giberelinas, el etileno regula el crecimiento de la raíz a través de las proteínas DELLA y desestabiliza las proteínas RGA inducidas por las giberelinas. Las proteínas DELLA integran la señal de ABA y etileno en la regulación del crecimiento radicular. El NPA no afectó a la formación de RAs de plantas insensibles al etileno, por lo que la insensibilidad al etileno podría tener un efecto similar a la aplicación de NPA (McDonald y Visser, 2003). El tratamiento con inhibidores de la actividad del etileno o de la síntesis del ácido jasmónico reduce la actividad inductora del EA de compuestos como 3-O-C10-HL, compuesto capaz de promover parcialmente el EA incluso en presencia de NPA (Bai *et al.*, 2012).

#### 5.2.1.5. Otras hormonas

Existen otras rutas de señalización adicionales o que interaccionan con la ruta de señalización auxínica que también están involucradas en la formación de RAs.

Los **brasinoesteroides** están relacionados con la ruta de señalización auxínica y por ello en el desarrollo de la raíz. Tiene un efecto dependiente de la dosis, su ausencia hace que se desarrollen raíces más cortas mientras que a bajas concentraciones estimulan el crecimiento radicular, posiblemente a través de la inducción de genes de respuesta auxinas, aunque este efecto no se produce a través de la estimulación de la biosíntesis de auxinas (revisado en Benková y Hejátko, 2009). La relación entre auxinas y brasinoesteroide es muy compleja. Las auxinas pueden inducir la biosíntesis y sensibilidad de la planta a los brasinoesteroides pero también su catabolismo, posiblemente el efecto sea dependiente de los tejidos (Paponov *et al.*, 2008). Altas concentraciones de brasinoesteroides ejercen un efecto negativo en el desarrollo radicular, posiblemente por la estimulación en la biosíntesis de etileno aunque también por su

interacción con otras rutas de señalización hormonal como la auxínica y del ABA (Benková y Hejálko, 2009).

El **ABA** se sintetiza principalmente en las raíces (E *et al.*, 2012). Esta hormona tiene un efecto inhibitor en el proceso de desarrollo de RLs y RAs ya que provoca la esterificación del AIA disminuyendo los niveles de AIA libres y controla, de forma directa o indirecta, la redistribución auxínica mediante la regulación del eflujo a través de genes de respuesta al ABA (Woodward y Bartel, 2005). El etileno inhibe la respuesta radicular al ABA, y a pesar de que no se conoce mucho sobre su papel en el desarrollo radicular sí que se ha observado que es necesario para la actividad meristemática de la raíz.

La **estríngolactona** inhibe la formación de RAs, y aunque puede asociarse con el declive del enraizamiento generado por la edad no es la principal causante de dicho declive, sino el cambio en la homeostasis de auxinas (Rasmussen *et al.*, 2015).

El **jasmonato**, es otra hormona vegetal que promueve la capacidad rizogénica principalmente en material juvenil. La acumulación de ácido jasmónico en el material adulto es más lenta y esto puede ser uno de los factores que afectan a la incapacidad de EA asociada con la edad (Rasmussen *et al.*, 2015). De nuevo interactúa con el resto de rutas de señalización hormonal, el etileno la promueve y las citoquininas la inhiben (Mauriat *et al.*, 2014).

### 5.2.2. El estado ontogenético del material

Una de las principales limitaciones en la propagación de individuos seleccionados se debe a la pérdida de capacidad proliferativa de los individuos adultos. Trippi (1963) estudió la variación en la capacidad proliferativa en función de la etapa ontogenética. En castaño es difícil obtener una respuesta organogénica a partir de explantos de tejidos aislados de individuos adultos. Los primeros logros en el cultivo *in vitro* de tejidos consistieron en la regeneración de yemas y RAs y embriones somáticos a partir de material muy juvenil, como cotiledones y epicótilos. Esto se debe a que las plantas leñosas a lo largo de su desarrollo pasan por cuatro estadios de desarrollo: embriogénico, juvenil vegetativo, adulto vegetativo y adulto reproductivo (Poethig, 1990, 2003). A lo largo de estas fases la planta va experimentando cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos como por ejemplo la morfología de tallos y hojas, el contenido hormonal y el ratio de fotosíntesis (Bonga, 1982; Hackett, 1985; Poethig, 1990; Haffner *et al.*, 1991; Greenwood and Hutchison, 1993; Greenwood *et al.*, 1997). Todos los procesos de desarrollo requieren de un patrón de expresión génica preciso que puede cambiar con la edad del individuo por lo que la

morfología y fisiología de los árboles y de sus órganos presentan diferencias asociadas con la edad (Day *et al.*, 2002). En eucalipto, en un análisis mediante microarray se observó que en la fase juvenil hay una mayor expresión de enzimas asociadas con los procesos de oxidación/reducción, mientras que en la fase adulta hay un enriquecimiento en factores de transcripción involucrados en la regulación del metabolismo secundario (Abu-Abied *et al.*, 2012). En el desarrollo normal de la planta estos cambios le aportan la capacidad de florecer, aumentan la producción de metabolitos secundarios y la sensibilidad a ciertos estímulos pero en detrimento del potencial de regeneración, la capacidad de crecimiento vegetativo y la plasticidad que se observa en los individuos juveniles, pudiendo modificar de esta manera su fenotipo y la respuesta ante estímulos ambientales, disminuyendo su capacidad morfogenética (Hutchison *et al.*, 1990; Day *et al.*, 2002).

La transición a la etapa adulta se conoce como maduración o cambio de fase, considerando que el individuo ha alcanzado la fase adulta o madurez cuando comienza a formar estructuras reproductoras (Besford *et al.*, 1996). Este es un proceso gradual en el que se modifica la expresión diferencial de genes, debido a modificaciones epigenéticas (Poethig, 1990; Day *et al.*, 2002; Díaz-Sala, 2014). El proceso de maduración presenta plasticidad, por lo que se ve influenciado por factores bióticos y abióticos, esto determina el tiempo requerido para que alcance la madurez. En especies leñosas la duración de la fase juvenil puede prolongarse desde un año a varias décadas e incluso antes de alcanzar la edad adulta ya se observan síntomas de declive de la capacidad morfogenética (Viéitez, 1974; Greenwood *et al.*, 1989; Greenwood y Weir, 1995; Besford *et al.*, 1996; Díaz-Sala *et al.*, 1996; Fett-Neto *et al.*, 2001). Estas modificaciones epigenéticas producen el silenciamiento de ciertos genes y la activación de otros, es un proceso dinámico que tiene lugar paulatinamente y está condicionado por estímulos ambientales. Los principales cambios epigenéticos que controlan la expresión diferencial de genes que modifica la respuesta del individuo en función de su grado de madurez son la remodelación estructural de la cromatina y la metilación del ADN. Estas modificaciones provocan la inactividad de genes, que no podrán expresarse aunque se apliquen los estímulos adecuados (Day *et al.*, 2002). Estudios recientes han mostrado que los siARN (small interfering RNA) y miARN (microRNA) pueden actuar como señales móviles para dirigir las modificaciones epigenéticas (revisado en Miguel y Marum, 2011).

Cuando hablamos de remodelación de la cromatina hacemos referencia al estado estructural de la cromatina en el núcleo, el ADN aparece condensado con diferente grado de empaquetamiento en diferentes regiones; las regiones condensadas van cambiando a medida que se produce el cambio de fase mediante la modificación de los residuos de histonas (H):



acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, carbonilaciones, glicosilaciones, etc.(Vaillant y Paszkowski, 2007). Aunque se acepten estas generalidades, la regulación es mucho más compleja y en ocasiones no se trata de la presencia de metilación sino del residuo de la histona que está metilado lo que determina si se produce activación o represión génica. Se sabe que el cambio de fase conlleva la reorganización a gran escala de la cromatina, pero no se conocen los factores que determinan como se produce esta reorganización y a que regiones afecta (Tessadori *et al.*, 2007; Valledor *et al.*, 2007).

La metilación del ADN se produce sobre el anillo pirimidínico de la citosina, esta metilación inhibe la transcripción génica (Colot y Rossignol, 1999). Mínimas diferencias en el grado de metilación pueden tener notables consecuencias en la respuesta y desarrollo de la planta. No se trata tanto del grado de metilación global del genoma, sino de los genes concretos afectados (Day *et al.*, 2002). La metilación aumenta con la edad y el cambio de fase, lo que coincide con el descenso de la actividad metabólica. Un claro ejemplo de esto es la fase de dormición de yemas, detectándose hipermetilación cuando baja el metabolismo e hipometilación cuando es más activo (Santamaría *et al.*, 2009). Además, los resultados de este trabajo sugieren que la hipermetilación del ADN y la desacetilación de H4 participan en la supresión de las divisiones celulares en los tejidos meristemáticos en dormición. La metilación del ADN es dinámica, controla la diferenciación celular específica de cada tejido y está estrechamente asociada con la adquisición y pérdida de competencia de las células (Valledor *et al.*, 2007). Sin embargo, en castaño los niveles de metilación durante la fase activa de crecimiento son mayores en material ontogenéticamente juvenil que maduro (Hasbún *et al.*, 2005).

La plasticidad fenotípica es la capacidad de adaptarse a cambios climáticos, colonizar diferentes ambientes, sobrevivir en zonas con cambios ambientales y responder rápidamente a diferentes estreses ambientales como luz, temperatura, humedad, etc. (Santamaría *et al.*, 2009; Bräutigam *et al.*, 2013). Son las modificaciones epigenéticas las que contribuyen a la plasticidad fenotípica y al potencial adaptativo. Diversos cambios ambientales o estreses, como por ejemplo la temperatura, pueden inducir cambios epigenéticos que se mantiene durante periodos de tiempo más o menos prolongados (Bräutigam *et al.*, 2013). Uno de los ejemplos más característico es de nuevo la dormición de yemas axilares, proceso controlado por diversos estímulos endógenos (como los niveles hormonales) y exógenos (como el ciclo de día, la temperatura y la luz)(Santamaría *et al.*, 2011). La dormición de yemas en castaño está controlada por diferentes modificaciones epigenéticas de forma que aumentan los niveles de metilación del ADN y disminuyen los de acetilación de la H4, pero este estado revierte

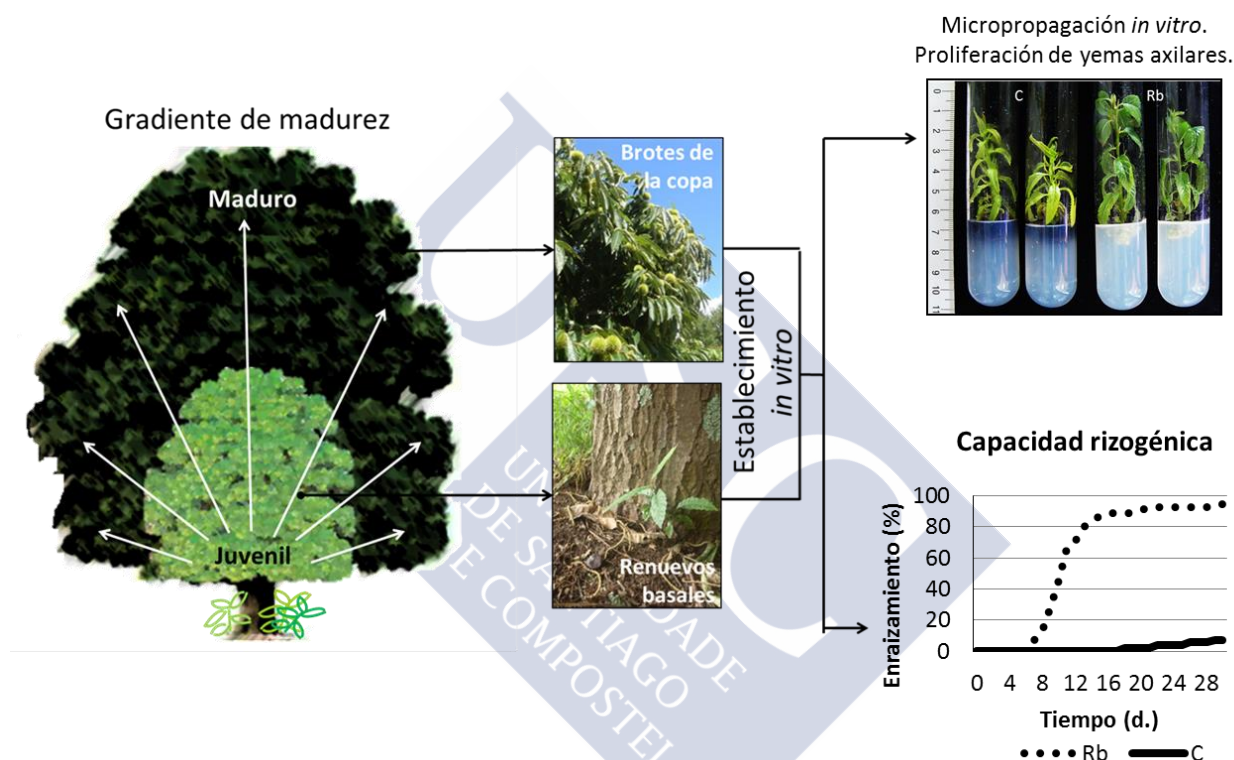
durante la brotación y proliferación de las yemas (Santamaría *et al.*, 2009). El cultivo *in vitro* es una clara prueba de la plasticidad de las células vegetales en respuesta a determinados estímulos exógenos asociada con la remodelación de la cromatina (Miguel y Marum, 2011). En el proceso de desdiferenciación celular se produce la activación de ciertas familias génicas de factores de transcripción que participan en el mantenimiento de las células meristemáticas como PLETHORA (PLT), WUSCHEL y GRAS por ejemplo, y la activación de genes implicados en la percepción y señalización hormonal. Las células desdiferenciadas adquieren carácter totipotente, es decir la capacidad de cambiar el patrón de expresión mediante los mecanismos de metilación del ADN (Day *et al.*, 2002). A continuación, el cambio en el balance de reguladores de crecimiento hace que se genere el nuevo patrón de diferenciación dirigiendo los procesos organogénicos en el cultivo *in vitro*.

El cambio de fase no altera las características de los órganos preexistentes, pero no desarrollados, esto hace que la juventud persista a lo largo del tiempo en algunas partes del árbol y que otras sean maduras o senescentes (Bonga, 1982). En la periferia o copa del árbol, los tejidos han sufrido un número mayor de divisiones celulares, incrementando con ellas su grado de madurez por lo que los nuevos meristemas, aunque son cronológicamente más jóvenes, ontogenéticamente son más maduros. Por el contrario, los meristemas formados durante la fase juvenil, que persisten en estado latente, a pesar de ser cronológicamente más viejos son ontogenéticamente juveniles. Podemos encontrar tejidos juveniles originados a partir de yemas latentes en los brotes epicórmicos, rebrotes de tocón, brotes de poda severa y los rebrotes de la raíz, ya que en general las raíces conservan más tiempo las características juveniles. De esta manera, los individuos presentan un gradiente de madurez a lo largo de la planta, que incrementa hacia la parte alta del árbol, mientras que en parte basal se encuentran tejidos que conservan las cualidades juveniles (Bonga, 1982; Hackett, 1985, 1987; Wendling *et al.*, 2014). Por todo ello, el empleo de material adulto procedente de tejidos con características juveniles incrementa la capacidad de respuesta, el establecimiento, la micropropagación y la capacidad rizogénica, mientras que tiene lugar una brusca y gradual pérdida de capacidad rizogénica a medida que ascendemos hacia la copa (Sánchez *et al.*, 1997b; revisado Abu-Abied *et al.*, 2012).

En castaño, con la finalidad de micropropagar material adulto, se han evaluado diversas técnicas de rejuvenecimiento permitiendo el establecimiento y mantenimiento en cultivo de material adulto, aunque su capacidad rizogénica en la mayoría de los casos sigue siendo escasa (Sánchez *et al.*, 1997a). Los trabajos de Sánchez y Viéitez (1991) en castaño y de Vidal *et al.* (2003) en roble demostraron la diferente capacidad morfogenética de brotes



establecidos en cultivo *in vitro* a partir de renuevos basales y ramas de la copa del mismo árbol adulto. Los brotes de las dos líneas de cultivo, juvenil y madura (Fig. 3), fueron empleados para el estudio del cambio de fase y de la capacidad de formación de RAs a nivel anatómico, fisiológico, bioquímico y molecular en castaño (Amo-Marco *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1997b; Ballester *et al.*, 1999; Fernández-Lorenzo *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2003; Covelo *et al.*, 2009; Vielba *et al.*, 2011), así como en otras especies como *Quercus robur*, *Q. rubra* (Sanchez *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2003). Sistemas similares también fueron utilizados en *Sequoia sempervirens* (Bon *et al.*, 1994) y *Hedera helix* L. (Geneve y Kester, 1991; Woo *et al.*, 1994).



**Figura 3:** Representación esquemática del gradiente de madurez desarrollado en árboles adultos y de las características del material (*Castanea sativa*).

## 6. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS

La diferenciación celular y el desarrollo están controlados por la activación y el silenciamiento espacial y temporal de genes específicos (Valledor *et al.*, 2007). Para llegar a comprender los mecanismos moleculares que controlan el proceso de EA es necesario conocer y entender el funcionamiento de los genes implicados en la reorganización celular, la

inducción de la división celular, la organización del primordio y el desarrollo y emergencia de la raíz (Díaz-Sala, 2014). Las células competentes para iniciar el desarrollo del meristemo radicular cambian radicalmente el patrón de expresión génica para dirigirlo a la nueva ruta de desarrollo. En este proceso participan genes reguladores involucrados en la iniciación y determinación del destino celular hacia la formación del primordio radicular y en muchos casos además participan durante el desarrollo y crecimiento de la raíz. El aislamiento y caracterización génica junto con el análisis de su patrón de expresión espacial y temporal es esencial para poder acercarnos a la identificación de su papel en el proceso de EA. La integración conjunta de la síntesis, el metabolismo y el transporte de auxina da lugar a la existencia de unos niveles controlados de la hormona en los tejidos, que serán los que dirijan el desarrollo de la planta al desencadenar la expresión diferencial de diferentes grupos de genes. Las auxinas provocan la acumulación rápida y transitoria de entre otras, tres familias génicas (revisado en Woodward y Bartel, 2005):

- *SAURs*: (Small Auxin Up RNA) relacionados con el desarrollo apical del brote (Park *et al.*, 2007), aunque no se conoce la función específica de la mayoría de estos genes. Se transcriben en ARNm altamente inestable. Pueden actuar como reguladores de la elongación celular (Paponov *et al.*, 2008).

- *GH3* (Gretchen Hagen 3): Se consideran genes marcadores de respuesta temprana a auxinas y se detectan rápidamente en respuesta a la inducción del EA. Participan en la regulación de los niveles de auxinas en los tejidos mediante la conjugación de AIA libre a aminoácidos (Staswick *et al.*, 2005). También participan en la regulación del ácido jasmónico conjugándolo a aminoácidos. Los genes *GH3-like* están correlacionados con el número de RAs desarrolladas (Brinker *et al.*, 2004; Sorin *et al.*, 2005).

- *Aux/AIA*: actúan como represores de la transcripción (Pop *et al.*, 2011). Estas proteínas en ausencia de auxinas se unen a los factores de transcripción reprimiendo la expresión génica. Al aumentar los niveles de hormona las *Aux/AIA* liberan los factores de transcripción temporalmente ya que a la vez la auxina induce la expresión de *Aux/AIA* para evitar el exceso de transcripción. Estos genes participan en el proceso de EA antes de que se inicien las primeras divisiones (Goldfarb *et al.*, 2003).

Debido a la rápida inducción de estas familias génicas, en cuestión de minutos, se cree que están implicadas en la percepción del estímulo auxínico y su transmisión. Tras la aplicación de auxinas se pueden establecer tres fases de control transcripcional. En la primera se induce rápidamente la expresión de genes que codifican para las enzimas de conjugación

de auxinas. Seguidamente se incrementa la síntesis de proteínas transportadoras de auxinas y cuando la exposición a auxinas se prolonga se inhibe la ruta de biosíntesis de auxinas (Paponov *et al.*, 2008). Existen dos familias de factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de respuesta a auxinas ya sea activándola o reprimiéndola; los *ARFs* “auxin response factor” y los “Aux/IAAs represors” (Parry y Estelle, 2006; Quint y Gray, 2006; Guilfoyle y Hagen, 2007).

Las ARFs son factores de transcripción que modulan los cambios de expresión génica desencadenados por la ruta de señalización auxínica, activando o reprimiendo la expresión de dichos genes. Actúan formando dímeros con otras ARF o con las proteínas Aux/AIA (Woodward y Bartel, 2005; Wang *et al.*, 2007). Además las ARF pueden participar en la regulación de los niveles de auxinas, por ejemplo ARF8 activa la expresión de algunos *GH3* implicados en la inactivación de auxinas. Se han descrito numerosos mutantes *arf* implicados en diversos procesos de desarrollo y en el crecimiento, entre ellos cabe destacar el *arf7* y *arf19* mutantes que reducen el número de RAs y RLs (Okushima *et al.*, 2005; Wilmoth *et al.*, 2005) y el doble mutante *arf10* y *arf16* que presenta alteraciones en la caliptra y en el gravitropismo de la raíz (Wang *et al.*, 2005). Las Aux/AIA inhiben la transcripción por ellas mismas o se unen a ARFs impidiendo que activen la transcripción (revisado en Guilfoyle y Hagen, 2007). Las ARFs requieren de la asociación a Aux/AIA represores para generar la respuesta génica desencadenada por auxinas.

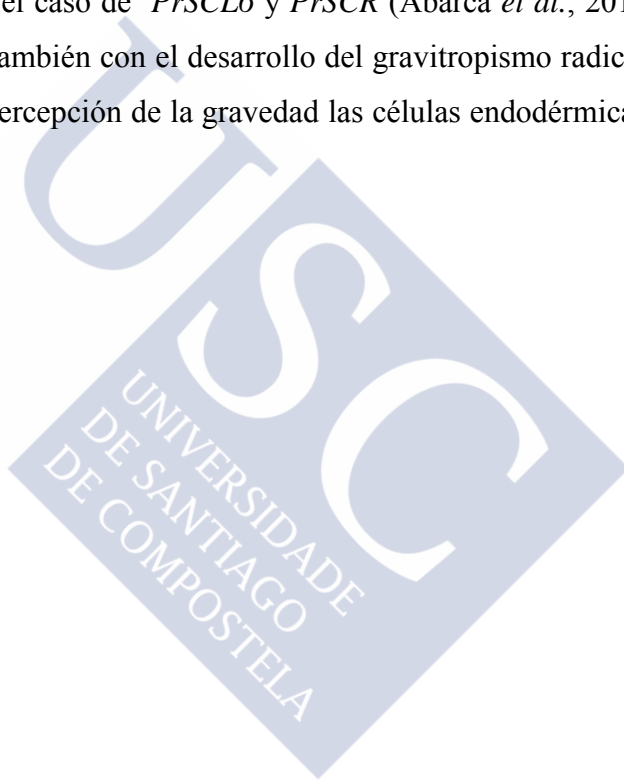
Empleando un “microarray” en *Pinus cordata*, se observó que 220 genes cambiaban significativamente los niveles de transcripción durante el desarrollo de RAs. En la fase de inducción se promueve la expresión de genes implicados en la replicación celular y la degradación de la pared celular mientras que se inhiben los genes implicados en el transporte de auxinas, la fotosíntesis y la síntesis de pared celular. Por el contrario, en la fase en desarrollo de los primordios existe una inducción de genes implicados en el transporte y la respuesta transcripcional de auxinas e implicados en la síntesis de pared celular. En estas dos fases también se altera la expresión de genes de respuesta al estrés hídrico. Finalmente durante la elongación radicular, se inhibe la expresión de genes implicados en la replicación celular y el estrés (Brinker *et al.*, 2004). Además, existe un gran número de genes involucrados en la señalización auxínica durante el proceso de EA, pero todavía no se conoce el mecanismo por el cual estas proteínas regulan la expresión de los genes que participan en los programas de desarrollo radicular (Li *et al.*, 2009). En otras especies forestales, también se han descritos genes concretos que parecen estar involucrados en la iniciación y desarrollo del EA. Butler y Gallagher (1999, 2000) identificaron el gen *ARRO-1*, que codifica para una

oxigenasa, y se expresa durante la etapa de inducción de la formación de RAs. Thomas y Schiefelbein, (2002) identificaron en *vid* un factor de despolimerización de actina que se induce rápidamente, a las 6 horas tras la aplicación del estímulo auxínico, durante la inducción de raíces, provocando la reorganización del citoesqueleto y alterando las propiedades de la pared celular durante la emergencia de las raíces, lo cual sugiere que no está implicado exclusivamente en la formación de raíces. Los genes *VvPRP1* y *VvPRP2* codifican para proteínas de pared ricas en prolina, que participan en la inducción y emergencia alterando las propiedades mecánicas de la pared celular (Thomas *et al.*, 2003). En *Pinus taeda* se han descrito cinco genes de la familia Aux/AIA inducidos por la aplicación de auxinas entre los 10 minutos y 3 horas tras el tratamiento (dependiendo del gen), y su expresión se mantiene por encima de los niveles basales durante al menos 7 días (Goldfarb *et al.*, 2003). Liu *et al.* (2014b) confirmaron que la expresión ectópica de los genes *PtoWOX4a*, *PtoWOX5a*, *PtoWUSa* y *PtoWOX11/12a*, implicados en el mantenimiento y proliferación de las células meristemáticas de diferentes órganos (ápice, raíz, cambium), promueve la regeneración de RAs. En otras especies, también se han descrito otros genes, como las ciclinas implicadas en la proliferación celular, que juegan un papel relevante en los primeros estadios del proceso de enraizamiento (Hemerly *et al.*, 1993). Otros genes afectan negativamente al EA, como *PtRR13* que actúa como modulador negativo de las etapas tempranas y es inducido por citoquininas (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009). Genes como *QrCPE* (Gil *et al.*, 2003) o las actinas (Greenwood *et al.*, 1997) que muestran expresión diferencial en función del estado ontogenético del material, se asocian a la capacidad morfogenética.

La organización y mantenimiento del meristemo radicular está regulada por la ruta de señalización auxínica que coordina la expresión de ciertas familias génicas como la familia AP2/ERF y la familia GRAS que actúan en paralelo. Para la especificación del nicho de células madre de la raíz y el control de su diferenciación, las auxinas inducen la expresión de los genes *PLT1* y *PLT2* (familia AP2/ERF), *SCR* y *SHR* (familia GRAS) (Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Vernoux y Benfey, 2005; Scheres, 2007; Cui y Benfey, 2009). En chopo, la familia de factores de transcripción AP2/ERF, es la que mostró mayor variación de los niveles de expresión durante el desarrollo de RAs, debido a su papel en el mantenimiento de la capacidad meristemática de las células y de la competencia para la proliferación células (Rigal *et al.*, 2012). La familia de proteínas AP2/ERF incluye 4 subfamilias; AP2 implicada en procesos de desarrollo y que participa en la señalización auxínica, RAV implicada en la respuesta a etileno, brasinoesteroides y estreses bióticos y abióticos, CBS/DREB que

promueve la resistencias a estreses abióticos y la subfamilia ERF principalmente implicada en la respuesta a estreses bióticos (Zhang *et al.*, 2009).

La familia GRAS es una familia de proteínas específicas de plantas, a la que dan nombre los tres primeros genes identificados: Giberellin-Acid Insensitive (GAI), Repressor of GA1 (RGA) y Scarecrow (SCR) (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998). Son putativos factores de transcripción involucrados en diversos procesos de desarrollo y estrechamente relacionados con el desarrollo de las raíces (Benfey and Scheres, 2000; Stuurman *et al.*, 2002). En pino se observaron diferencias en el patrón de expresión de diversos genes de la familia GRAS en función del tejido y proceso de desarrollo. Algunos de estos genes están relacionados con la competencia y reprogramación de células adultas para la formación de RAs, como es el caso de *PrSCL6* y *PrSCR* (Abarca *et al.*, 2014). La actividad del *SCR/SHR* está asociada también con el desarrollo del gravitropismo radicular, localizando como centro receptor de la percepción de la gravedad las células endodérmicas (Tasaka *et al.*, 1999).



# Objetivos







La pérdida de la capacidad de regeneración en muchas especies forestales, asociada al crecimiento y maduración que tiene lugar a medida que aumenta la edad de los individuos, es una de las principales limitaciones en cualquier sistema de propagación vegetativa. Uno de los principales cuellos de botella en la propagación clonal de genotipos élite es la pérdida de la capacidad de enraizamiento del material adulto. En los últimos años se han realizado importantes avances en el estudio de las bases fisiológicas y moleculares que controlan este proceso, así como en el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas que permitan la selección y propagación de individuos elite de especies forestales. Sin embargo es necesario profundizar en el conocimiento de los genes implicados en la desdiferenciación celular y adquisición de un nuevo destino celular, tras el estímulo necesario para desencadenar el EA y en la regulación de estos genes.

El objetivo general de esta Tesis es la caracterización de genes implicados en la formación de RAs, el análisis de su expresión y su regulación. Para llevar a cabo este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo y validación de un sistema experimental de hojas *in vitro*, para estudiar el EA en castaño a nivel fisiológico y molecular.
2. Estudio del transporte polar de auxina, mediante inhibidores del mismo, en el EA de castaño.
3. Identificación de genes de diferentes familias (GRAS, GH3, RLK, UGT, ENOD) como posibles reguladores del proceso de enraizamiento.
4. Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de los genes identificados y otros previamente caracterizados en nuestro laboratorio:
  - a. Análisis de la expresión en diferentes órganos.
  - b. Análisis de la expresión génica en respuesta a la auxina y en función del estado ontogenético del material.
  - c. Análisis del efecto del NPA en el patrón de expresión génica.
5. Modulación de la respuesta rizogénica de *Populus* mediante señalización de auxinas y giberelinas.
  - a. Caracterización de la respuesta fisiológica a la manipulación hormonal.
  - b. Estudio de la regulación del gen SHR durante el enraizamiento.



# Material y Métodos



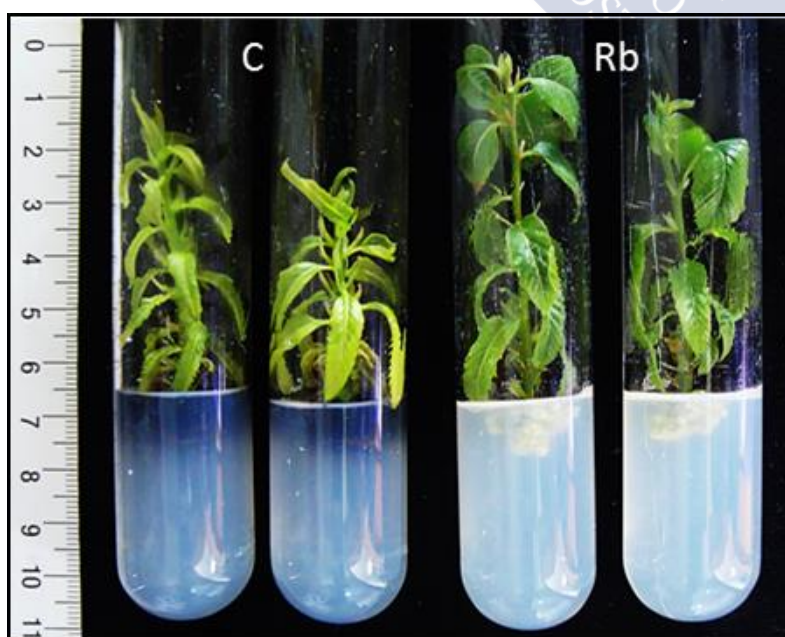
## A. *CASTANEA SATIVA*

### 1. MATERIAL VEGETAL

#### 1.1. LÍNEAS DE CULTIVO

Se emplearon dos líneas de brotes de castaño (*Castanea sativa* Mill.) establecidos en cultivo *in vitro* a partir de brotes de la copa y renuevos basales de un mismo árbol adulto, de unos 80 años (clon P2). Ambas líneas se mantuvieron en cultivo *in vitro* desde hace más de 20 años mediante micropropagación de yemas axilares siguiendo el procedimiento detallado en Sánchez y Viéitez (1991).

Ambas líneas (Fig. 4) poseen el mismo genotipo pero diferente estado ontogenético, que se refleja en sus características morfológicas y fisiológicas. La línea establecida a partir de las yemas de renuevos basales (P2Rb) conserva las características del estado juvenil, sin haber sufrido las modificaciones epigenéticas que se desarrollan con la maduración o cambio de fase. Este material se caracteriza por presentar hojas bien desarrolladas, entrenudos elongados, crecimiento vigoroso y además por tener gran capacidad morfogenética y elevada capacidad rizogénica en respuesta al tratamiento hormonal. Por el contrario la línea establecida a partir de brotes de la copa (P2C) presenta características asociadas a individuos adultos: una capacidad rizogénica muy baja, hojas senescentes y necrosis apical como resultado del proceso de maduración (Ballester *et al.*, 1999, 2009).



**Figura 4:** Brotes del clon P2 al final del periodo de multiplicación. A la izquierda brotes de la línea P2C, adulto, y a la derecha brotes de la línea P2Rb, que conserva las características juveniles.

## 1.2. MANTENIMIENTO DE LOS BROTES EN PROLIFERACIÓN

Para la propagación y mantenimiento de los brotes *in vitro* se empleó el medio GD cuya composición se detalla en la Tabla 1, suplementado con sacarosa (3%) como fuente de carbono, Difco-Bacto-Agar (0,8%) como agente gelificante y 6-Benciladenina (BA) 0,075 mg/L (Sigma-Aldrich, Damstadt, Alemania), citoquinina que promueve el desarrollo de las yemas axilares, el crecimiento de los brotes y su elongación. Se ajustó el pH a 5,6 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

En la fase de proliferación, los brotes se mantuvieron en un régimen de subcultivo de cuatro semanas, pasado este período, se retiraron las hojas y el callo basal de los brotes, se dividieron en segmentos de una longitud aproximada de 1,5 cm manteniendo las yemas axilares intactas, los cuales fueron transferidos a medio fresco para comenzar un nuevo ciclo de crecimiento. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas, con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, luz suministrada por tubos fluorescentes con una intensidad lumínica de 30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  y con temperatura de 25°C durante las horas de luz y 18°C durante el periodo de oscuridad.

**Tabla 1:** Composición del medio de cultivo de Gresshoff y Doy (1972).

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/L	Vitaminas	mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	3	Tiamina HCl	1
KNO <sub>3</sub>	1000	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	10	Ac. nicotínico	0,1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3	Piridoxina HCl	0,1
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	250	CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,25	Glicina	0,4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30	MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25	m-inositol	10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	90	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,25		
KCl	300	KI	0,75		
Fe-Na-EDTA	36,7				

## 2. ENRAIZAMIENTO

### 2.1. TIPOS DE EXPLANTOS

Para la evaluación de la capacidad rizogénica de castaño se emplearon tres tipos de explantos (Fig. 5), obtenidos de los brotes de cuatro semanas (de entre 2,5 - 3,5 cm de longitud) en fase de proliferación:

- *Brotes completos*: a los que se retiró el callo y las hojas de la zona basal.
- *Hojas aisladas*: se recogieron las tres primeras hojas expandidas de cada brote. Las hojas enteras se colocaron con el envés sobre el medio de cultivo y con el peciolo sumergido en él.



- *Secciones de hojas*: se utilizaron las tres primeras hojas expandidas y se cortaron transversalmente en tres partes (a través del nervio central): parte basal (incluye el peciolo), parte media y parte apical. Cada uno de los fragmentos se colocó en el medio de cultivo manteniendo la polaridad de los mismos, inoculando en el medio la zona basal de cada uno de ellos.



**Figura 5:** Explantos de castaño utilizados para evaluar su capacidad rizogénica: brotes, hojas y secciones de hojas.

## 2.2. INDUCCIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN BROTES

La inducción del enraizamiento se llevó a cabo mediante la aplicación de AIB. Los brotes de la línea P2Rb se sometieron a dos tratamientos distintos, bien mediante la inmersión basal del brote (“dipping”) en una solución hidro-alcohólica de AIB con una concentración de 4,9 mM durante 1 minuto, o mediante la incubación de los brotes durante 24 horas en medio de cultivo conteniendo una concentración de AIB (75µM), siendo transferidos posteriormente a medio fresco, sin hormonas. Los brotes sin tratamiento hormonal fueron empleados como control. Como medio de cultivo para el enraizamiento se empleó el medio GD reduciendo a  $\frac{1}{3}$  la concentración de macronutrientes ( $GD^{\frac{1}{3}}$ ).

## 2.3. INDUCCIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN HOJAS

En el caso de las hojas (P2Rb y P2C) y las secciones de hojas de la línea P2Rb, tras una evaluación previa de diversas concentraciones de AIB y diversos periodos de aplicación, se seleccionó como tratamiento inductor la aplicación de AIB 25 µM añadido en el medio de cultivo y mantenido en condiciones de oscuridad durante 5 días. Posteriormente las muestras fueron transferidas a medio sin reguladores de crecimiento y con las mismas condiciones de fotoperiodo que se emplearon en los ciclos de crecimiento. Como medios de cultivo durante el enraizamiento se utilizaron el medio GD y el medio MS con la concentración de macronutrientes reducida a  $\frac{1}{3}$  ( $GD^{\frac{1}{3}}$ ) o a  $\frac{1}{2}$  ( $MS^{\frac{1}{2}}$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Composición del medio de cultivo de Murashige and Skoog (1962)

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/L	Vitaminas	mg/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	6,2	Tiamina HCl	0,1
KNO <sub>3</sub>	1900	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	16,9	Ac. nicotínico	0,5
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	332	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,6	Piridoxina HCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	180	CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,025	Glicina	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25	m-inositol	100
		CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025		
		KI	0,83		
Fe-Na-EDTA	36,7				

## 2.4. EFECTO DEL NPA SOBRE LA RESPUESTA RIZOGÉNICA DEL CASTAÑO

A partir de experimentos preliminares se seleccionó la concentración de 50  $\mu$ M de NPA para evaluar su efecto en la capacidad rizogénica del castaño. Dicha concentración se utilizó en todos los ensayos posteriores realizados en brotes y hojas. El NPA se esterilizó por filtración (empleando filtros de 0,20  $\mu$ m) y se adicionó al medio de enraizamiento una vez autoclavado.

### 2.4.1. Efecto del tiempo de exposición al NPA en brotes

Empleando brotes de la línea P2Rb tratados con AIB, bien mediante “dipping” (4,9  $\mu$ M/1min) o con 75  $\mu$ M/24h, se evaluó el efecto de la presencia de NPA 50  $\mu$ M en el medio, durante 0, 5, 8 y 30 días desde el inicio del experimento. Transcurrido ese tiempo, los brotes se transfirieron a medio GD<sup>1</sup>/<sub>3</sub> sin reguladores de crecimiento.

### 2.4.2. Efecto del momento y tiempo de aplicación del NPA en hojas

**Tabla 3:** Tratamientos empleados para la evaluación del efecto del NPA durante la inducción y desarrollo de raíces adventicias en hojas de castaño

Tratamientos	Días																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
T1	AIB 25 μM																													
T2	AIB 25 μM																													
	NPA 50 μM																													
T3	AIB 25 μM																													
	NPA 50 μM																													
T4	AIB 25 μM																													
	NPA 50 μM																													
T5	AIB 25 μM																													
	NPA 50 μM																													
T6	AIB 25 μM																													
	NPA 50 μM																													
T7	AIB 25 μM					NPA 50 μM																								
T8	AIB 25 μM					NPA 50 μM																								

En un primer ensayo se evaluó el efecto de la aplicación de NPA durante 5 días, en los dos medios de cultivo ensayados ( $GD^{1/3}$  y  $MS^{1/2}$ ), sobre la capacidad de enraizamiento. Tras seleccionar el medio  $GD^{1/3}$  para llevar a cabo los estudios de enraizamiento en hojas, se evaluó el momento de aplicación de NPA en la respuesta rizogénica. Para ello se aplicó NPA ( $50 \mu M$ ) durante 5 días, bien simultáneamente con el tratamiento de auxina así como 24, 48, 72, 96 y 120 horas tras el inicio del tratamiento con AIB. Además se analizó el efecto de prolongar el tratamiento de NPA hasta 25 días tras el tratamiento con AIB (véase Tabla 3).

## 2.5. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Transcurridos 30 días tras la aplicación de los diferentes tratamientos, se evaluó la capacidad rizogénica y otros parámetros fisiológicos relativos al estado de los explantos. Para ello se consideraron los siguientes parámetros:

- *Cinética del proceso*: se obtuvo calculando cada día tras la iniciación del tratamiento el porcentaje de explantos enraizados (número de explantos enraizados / número total de explantos x 100).
- *Enraizamiento (%)*: porcentaje total de explantos enraizados transcurridos 30 días.
- *Emergencia (d)*: número medio de días requeridos para la emergencia de la primera raíz adventicia por explanto.
- *Nº raíces*: número medio de raíces desarrolladas por explanto enraizado.
- *Longitud (mm)*: longitud media de la raíz más larga por explanto enraizado.
- *Nº RFC*: número medio de raíces desarrolladas fuera del callo basal por explanto enraizado.
- *Raíces laterales (%)*: porcentaje de brotes enraizados que presentan raíces laterales.
- *Callo (%)*: porcentaje de explantos que presentan formación de callo basal.
- *Necrosis (%)*: porcentaje de brotes enraizados que presentan necrosis apical.
- *RC (%)*: reemprendimiento de crecimiento, considerando el porcentaje de brotes enraizados en los cuales, alguna yema lateral retoma el desarrollo.

Para el análisis estadístico de los datos, todas las variables que corresponden a porcentajes fueron transformadas mediante la función:

$$\arcsen\left(\sqrt{\frac{\%}{100} \times \frac{360}{2\pi}}\right)$$

Los datos obtenidos, que presentaron homogeneidad de varianzas (Estadístico de Levene), se analizaron estadísticamente mediante el test Duncan y se establecieron diferencias significativas para  $P \leq 0,05$  o  $P \leq 0,01$ , cuando fue posible establecer estas diferencias.

Aquellos datos que no presentaban homogeneidad de varianzas se evaluaron mediante el test t de Student, estableciendo diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ . Además, se realizó el análisis univariante para la identificación de interacciones entre el los tratamientos hormonales de AIB y NPA y entre estos y el medio de cultivo. Se consideró que los valores de expresión se deben a la interacción de ambos factores para valores  $P \leq 0,05$ . En cada tratamiento se emplearon 18 explantos y se realizaron tres replicados biológicos.

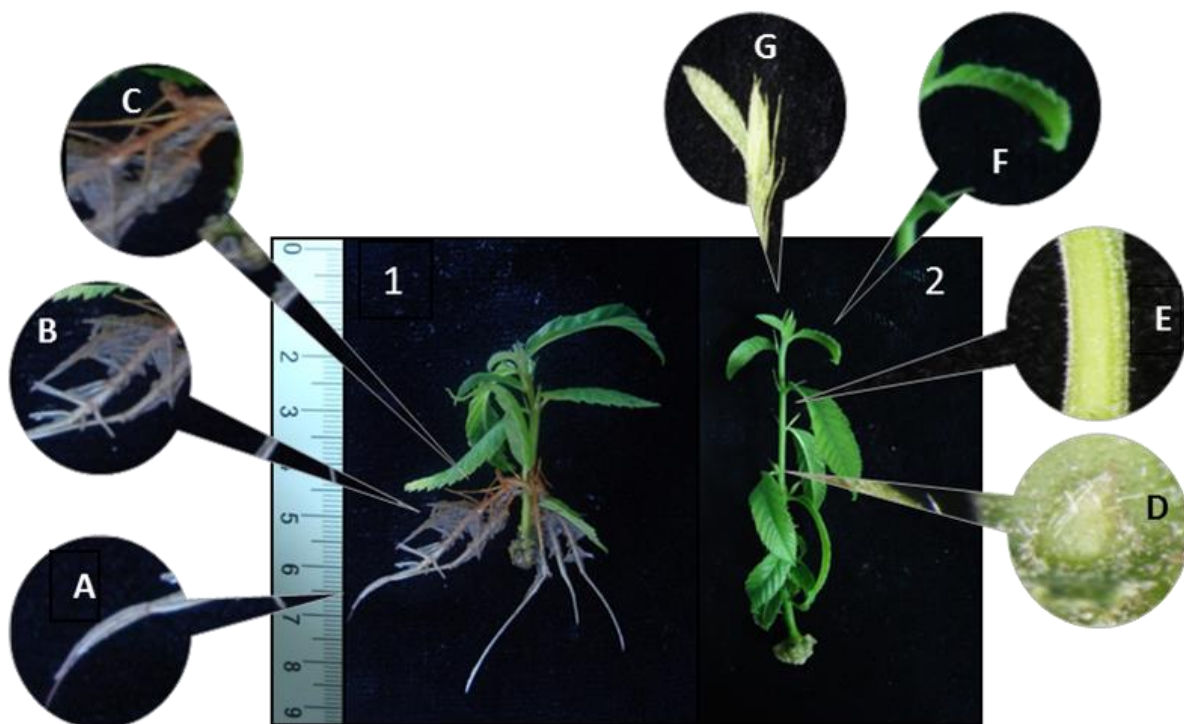
### 3. MATERIAL RECOGIDO

Se utilizaron diferentes materiales de las líneas P2C y P2Rb, procedentes de los ensayos de enraizamiento así como de brotes en multiplicación. Para la evaluación de muestras de los diferentes órganos de brotes del clon P2Rb (Fig. 6), al final del periodo de multiplicación se recogieron por separado las siguientes partes: ápice (incluyendo las primeras hojas aun no expandidas), hojas, entrenudos y yemas axilares. Las raíces se recogieron a partir de brotes P2Rb a los 30 días tras la aplicación del tratamiento con auxina, y dichas raíces se dividieron en 3 partes: zona apical (de aproximadamente un centímetro), zona media y zona basal (de 1 a 1,5 cm de la raíz más próximos al brote).

En el caso del material procedente de los ensayos de enraizamiento en brotes P2Rb, se recogieron simultáneamente muestras control (sin tratamiento auxínico), muestras tratadas con AIB exclusivamente y tratadas con AIB y NPA. De dichos brotes se recogió la zona basal ya que se trata del área donde con más frecuencia observamos la respuesta rizogénica (aproximadamente 1 cm), a diferentes tiempos tras la aplicación de los tratamientos (15 minutos, 6, 12 y 24 horas, 10 y 14 días).

En la evaluación de la respuesta rizogénica de las hojas, se recogieron muestras control y tratadas con AIB de ambas líneas (P2C y P2Rb) y muestras de la línea P2Rb tratadas con AIB y NPA simultáneamente a las 6, 12, 24 y 72 horas, 5 y 10 días tras iniciar los tratamientos. Para las extracciones de ARN se recogieron las hojas completas, mientras que para los estudios histológicos se recogió la zona basal (área del peciolo).

El material vegetal fue recogido, congelado en nitrógeno líquido y almacenado en frío a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser usado para realizar la extracción de ARN o bien directamente embebido tras su recolección para el análisis histológico, como se explicará en el apartado siguiente.



**Figura 6:** Órganos de la línea P2Rb utilizados para el análisis de la expresión génica. Las raíces desarrolladas a los 30 días tras el tratamiento auxínico (1) se dividieron en zona apical (A), zona media (B) y zona basal (C). Los brotes al final del periodo de proliferación (2) se separaron en: yemas axilares (D), entrenudos (E) hojas (F) y ápice (G).

#### 4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Como acabamos de mencionar, se recogieron muestras tanto de los brotes al final del periodo de proliferación como procedente de los ensayos de enraizamiento a diferentes tiempos y con diferentes tratamientos (control, AIB, AIB y NPA) de los diferentes explantos empleados, tanto brotes como hojas de ambas líneas de cultivo (P2C y P2Rb). Las muestras fueron embebidas y congeladas en Jung tissue freezing medium (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Germany) y mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Posteriormente, las muestras embebidas se seccionaron en cortes transversales y longitudinales de  $10\ \mu\text{m}$  empleando un criostato Leica CM 1850. Las secciones se recogieron en portaobjetos tratados con 3-aminopropyl-triethoxysilano para aumentar la adherencia, fueron secadas a  $40^{\circ}\text{C}$  y fijadas empleando un baño de 10 minutos de etanol: ácido acético glacial 3:1 (v/v) seguido de otro en etanol al 70% durante 5 minutos, ambos en frío a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas secciones, fueron utilizadas directamente o se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior



utilización, para ser teñidas con azul de toluidina o empleadas para realizar el análisis de expresión génica mediante hibridación *in situ*.

## 5. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS GÉNICAS

### 5.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

El ARN total fue extraído empleando diferentes kit comerciales dependiendo del tipo de material para mejorar el rendimiento de las mismas. En el caso de las bases de los brotes el ARN total fue extraído empleando el kit Plant/fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek corp.), y se realizó el tratamiento con ADNasa en la columna empleando On-Column DNase I Digestion set (Sigma Aldrich). Para el resto de tejidos se utilizó el kit FavorPrep Plant Total RNA purification Mini Kit (for woody Plant) (Favorgen Biotech corp.), y las muestras se trataron con RQ1 RNase-free DNaseI (Promega, Madison, WI) para eliminar la contaminación con restos de ADN genómico. En los dos casos el procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones de los fabricantes. La pureza y concentración de las muestras de ARN fue determinada por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, EEUU) y la integridad del ARN fue comprobada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% (p/v) con GreenSafe Premium (nzytech), en donde se visualizan las dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S.

### 5.2. OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS GÉNICAS

#### 5.2.1. Diseño de cebadores

Mediante análisis bioinformáticos y empleando las bases de datos disponibles en el “**National Center for Biotechnology Information**” ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y en “**Fagaceae Genomics Web**” ([www.fagaceae.org](http://www.fagaceae.org)) se identificaron genes de otras especies implicados en el proceso de enraizamiento y se diseñaron cebadores específicos (Tabla 4) empleando el programa Primer3 disponible en la página web del “Whitehead Institute for Biomedical Research, Rozen, Remm, Koressaar y Skaletsky” (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012).



**Tabla 4:** Cebadores para la obtención de las secuencias génicas.

GEN	Cebadores	Secuencia
<i>CsENOD93</i>	CsENod Rv1	5'-TGAAATATGCCGCTCCTGCCACTGT-3'
	CsENod Fw1	5'-GCCATTCTCCCAGAACTTTTCATCC-3'
	CsENod Fw2	5'- CCAAGCGCTGTTCTCATGAG -3'
<i>CsGH3-2</i>	CsGH3.2 Rv1	5'- CAACTCGGCCTTGTCTGTACA -3'
	CsGH3.2 Fw1	5'-ACACCCAGCCCCAGGCAGTCTTTAC-3'
	CsGH3.2 Fw2	5'-ATGGCTGTTGGTTCTGCTATTTCA-3'
	CsGH3.2 Fw3	5'-GGCCGAGTTACAGAAAGCCGTGGAG-
<i>CsSCR1</i>	CsSCR1 Rv1	5'-AAAGGCCTCCAGGCAGAAGCAGTGA-3'
	CsSCR1 Rv2	5'-CGCATTGCAAGAGCAAGGTGAGGAG-3'
<i>CsSCL3</i>	CsSCL3 Rv1	5'-TCCTTGCCCTCCATTTGCCTGCTAC-3'
	CsSCL3 Fw1	5'-GCGAGACCAGCTTCTTCGGATGGTT-3'
	CsSCL3 Fw2	5'-GAAGCAGCCTTCCTCTAACACTCAGCA-3'
<i>CsSHR1</i>	CsSHR1 Rv1	5'-GCGTACCTTCTTTACACGC-3'
	CsSHR1 Rv2	5'-CCCACACCACCGGCTGATCC-3'
	CsSHR1 Fw1	5'-CGTTACACTCCACCACAACCGT-3'
	CsSHR1 Fw2	5'-ATGGATACCTTGTTTAGGC-3'
<i>CsSHR2</i>	CsSHR2 Rv1	5'-TGGAACATTTGAATCACAGCTCCT-3'
	CsSHR2 Fw1	5'-ATGGACATAACTCTTTTCACTCCGGA-3'
	CsSHR2 Fw2	5'-TTGGGGCCTTGAGAAGAGCGGAAGT-3'
<i>CsUGT</i>	CsUGT Rv1	5'-CCTCAATTGAACTGCTACTGCTC-3'
	CsUGT Rv2	5'-CTAGGGCTGGCATCCAAAGGCTGAA-3'
	CsUGT Fw1	5'-CATGTAGCCATGTTTCCCTGGTTTGC-3'
	CsUGT Fw2	5'-ATGGGTGTATGGGGGATGGGTGCCA-3'

### 5.2.2. Síntesis de ADNc, RACE y PCR

La síntesis de ADNc y la amplificación de las secuencias génicas se llevó a cabo empleando el kit de RACE “SMART<sup>TH</sup> RACE” de CLONTECH. La técnica de RACE “Rapid Amplification of cDNA Ends” (Bertioli, 1997), facilita la obtención de los extremos 3' y 5' de las secuencias génicas ya que durante la transcripción se añade un oligonucleótido a los extremos de los ADNc sintetizados. Para llevar a cabo la PCR se utilizó un cebador específico de la secuencia génica a amplificar (de los incluidos en la Tabla 4) y un cebador estándar (UPM, “Universal Primer Mix”) que se une al oligonucleótido añadido en el extremo del ADNc. En algunos casos las secuencias se obtuvieron mediante PCR tradicional, empleando estos mismos ADNc. Para cada PCR se ajustó tanto la composición (la cantidad de ADNc y

cebadores) como las condiciones de las reacciones (temperatura y/o el tiempo de anillamiento de los cebadores y el tiempo de extensión). En las Tablas 5 y 6 se muestran las condiciones más frecuentemente empleadas en las reacciones.

**Tabla 5:** Condiciones para el desarrollo de las reacciones de RACE y PCR

Condiciones para RACE			Condiciones para PCR		
5 Ciclos	94°C	8 s	1 Ciclo	95°C	5 min
	72°C	12 s	35 ciclos	94°C	45 s
	72°C	3 min		60°C	45 s
5 Ciclos	94°C	8 s		72°C	3 min
	70°C	12 s	1 Ciclo	72°C	5 min
	72°C	3 min		4°C	∞
20 Ciclos	94°C	8 s			
	68°C	12 s			
	72°C	3 min			
1 Ciclo	72°C	5 min			
	4°C	∞			

**Tabla 6:** Componentes de las reacciones de PCR y RACE

Componentes	μl
H <sub>2</sub> O	Hasta volumen final de 25
10x Advantage® 2 SA PCR Buffer	2,5
dNTPs Mix (10 mM)	0,5
Cebador específico (10 μM)	0,5-1
UPM o 2° cebador específico	1-2,5 μl o 0,5-1
50x Advantage® 2 Polymerase Mix	0,5
ADNc (4,5 ng/μl)	1,5-2,5

### 5.3. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Los fragmentos obtenidos mediante RACE se clonaron empleando el kit comercial “TA Cloning® Kit Dual Promoter (pCR®II)” de la compañía InvitroGen (Carlsbad, California, EEUU). Dicho kit incluye el vector pCR®II y las células competentes de *Escherichia coli* de la cepa INVαF (genotipo F'endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169λ-). La inserción del producto de amplificación al vector se catalizó por la enzima T4 ligasa; esta reacción se llevó a cabo durante 10 horas a temperatura constante de 14°C. A continuación, mediante transformación, se introdujeron los vectores recombinados en las células competentes mediante choque térmico en un baño termostatzado a 42°C durante 45 segundos. Tras la transformación, las bacterias se sembraron en placas con medio de Luria-Bertani (Tabla 7) con 50 mg/L de sulfato de kanamicina A (Duchefa), como agente de selección de las bacterias transformadas y 1,6 mg de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-Galactopiranósido, Duchefa) para la identificación de las colonias transformadas que portan el inserto.

**Tabla 7:** Composición del medio de Luria-Bertani (LB).

Composición	gr/L
Bacto-triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro sódico	9

Para confirmar la inserción del fragmento de interés en el vector, se realizó una reacción de PCR directamente a partir de las colonias, empleando como cebadores el M13Rv (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') y M13Fw (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') presentes en las regiones flanqueantes del sitio de clonación del vector. En la Tabla 8 se muestra la composición y las condiciones empleadas para desarrollar dicha PCR.

La empresa Secugen S.L. fue la encargada de la secuenciación empleando el servicio de secuenciación de plásmidos directamente de colonia y el equipo empleado fue BigDye® Terminator v3.1.

**Tabla 8:** Componentes y condiciones para la reacción de PCR a partir de colonia.

Componentes	μl	Condiciones		
H <sub>2</sub> O	6,1	30 Ciclos	94°C	30 s
10x Buffer	1		45°C	30 s
dNTPs Mix (250 μM)	0,8		72°C	2 min
Cebador M13Rv (2 μM)	1	1 Ciclo	72°C	5 min
Cebador M13Fw (2 μM)	1		4°C	∞
Dream taq (Fermentas)	0,1			

#### 5.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

A partir de la secuencia de nucleótidos se predijo la secuencia de aminoácidos que compone la proteína empleando la herramienta de traducción “translate tool” disponible en la página web del “Swiss Institute of Bioinformatics” (<http://web.expasy.org>). Empleando esta misma página y utilizando la herramienta “protparam” se estimaron las principales características de estas proteínas, la masa molecular y el punto isoeléctrico (Gasteiger *et al.*, 2005). También se identificaron los motivos característicos de la proteína empleando la herramienta “ScanProsite”. Mediante el programa BLASTP (Altschul, 1997) suministrado en la página del “National Center for Biotechnology Information” ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) se analizaron las homologías entre las secuencias obtenidas y las secuencias disponibles en las bases de datos. Empleando la página web <http://www.uniprot.org> se identificó la presencia de dominios transmembrana. Finalmente, en las proteínas de la familia GRAS, se evaluó el desorden intrínseco empleando la herramienta “disprot” de la página <http://www.disprot.org/pondr-fit.php> (Xue *et al.* 2010).

En algunas de las secuencias nucleotídicas aisladas, en las cuales se disponía de parte de la región promotora 5'UTR, se analizó esta región para localizar motivos característicos, en la

página web <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> empleando la herramienta “PlantCARE” (Lescot *et al.*, 2002).

Empleando el programa Clustal Omega (disponible en la página <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), se alinearon las secuencias aminoacídicas obtenidas con algunas homólogas, para obtener información sobre las propiedades estructurales y funcionales de estas proteínas. De esta manera se identificaron los motivos conservados característicos de las familias y los aminoácidos conservados implicados en la funcionalidad de las proteínas.

Debido a las características de la familia UGT también se elaboró la representación gráfica del dominio PSPG, empleando las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético (Tablas 11) y la página web <http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>.

Por último, se realizó el árbol filogenético de estas familias génicas incluyendo las secuencias de muchos de los genes de *Arabidopsis*, nuestras secuencias, algunos de los genes más homólogos obtenidos en BLAST y otras proteínas de interés por su caracterización. Para su construcción se utilizó el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), empleando el algoritmo “Neighbor-Joining”, dichos árboles son el resultado de 1000 réplicas con bootstrap y en el caso del árbol filogenético de la familia GRAS se usó como “outgroup” una proteína humana perteneciente a la familia STAT (Hs SRC; NP004374). En las Tablas 9, 10, 11 y 12 se muestran las proteínas empleadas para el análisis filogenético de las familias GRAS, GH3, UGT y ENOD y el número de acceso en GenBank.

**Tabla 9:** Proteínas empleadas en el análisis filogenético de la familia GRAS y su número de acceso en el GenBank.

AtGAI AEE29242	AtPAT1 AED95625	AtRGA NP_178266	AtRGL1 AEE34499
AtRGL2 NP_186995	AtRGL3 AED92433	AtSCL1 Q9SDQ3	AtSCL3 AEE32546
AtSCL4 AED98261	AtSCL5 NP_175475	AtSCL6 AEE81829	AtSCL7 NP_190634
AtSCL8 AED96223	AtSCL9 AEC09430	AtSCL11 AED97191	AtSCL13 NP_193456
AtSCL15 NP_195389	AtSCL18 AEE33268	AtSCL23 AED94744	AtSCL26 AEE82614
AtSCL27 AEC10518	AtSCL28 NP_176498	AtSCL29 AEE75423	AtSCL30 AEE78178
AtSCR AAB06318	AtSHR AEE86820	CsSCL1DQ683579	Hs SRC NP004374
LaSCR1 ACQ84011	LISCL AB106274	MdSCL ADL36813	PrSCL1 ABG77970
PsSCR Q9AVK4	PtGRAS XP_002323112	PtGRAS1 XP_002302201	PtSCL AEK86265
QiSHR1 AIO08306	QiSHR2 AIO08307	QsSHR AET37154	QsSHR2 AIO08308
RcCIGR XP_002520249	Vv CAN65092	VvSCL XP_002264349	VvSCL9 XP_002267055

**Tabla 10:** Proteínas empleadas en el análisis filogenético de la familia GH3 y su número de acceso en el GenBank.

AtGH3.1 NP_179101	AtGH3.2 Q9SZT9	AtGH3.3 O22190	AtGH3.4 Q9LQ68
AtGH3.5 O81829	AtGH3.6 Q9LSQ4	AtGH3.7 NP_173729	AtGH3.8 NP_199960
AtGH3.9 O82243	AtGH3.10 NP_192249	AtGH3.12 NP_196836	AtGH3.13 NP_196839
AtGH3.14 NP_001190301	AtGH3.15 NP_196841	AtGH3.16 NP_196842	AtGH3.17 NP_849718
AtGH3.18 NP_175299	AtGH3.19 NP_175300	AtJAR1 NP_001189757	CsGH3.1 AFC36443
GrGH3.1 XP_012480180	JcGH3.1 XP_012093069	PtGH3 XP_002300248	QrGH3.1 AFC36444
TcGH3 XP_007042570	VvGH3.1 XP_002271252		

**Tabla 11:** Listado de proteínas empleadas en el análisis filogenético de la familia UGT y su número de acceso en el GenBank.

AtUGT71B1 NP_188812	AtUGT72C1 CAB16822	AtUGT73C1 NP_181213	AtUGT74C1 NP_180738
AtUGT75C1 NP_193146	AtUGT76B1 NP_187742	AtUGT78D3 NP_197205	AtUGT79B1 NP_200217
AtUGT79B9 NP_200210	AtUGT82A1 NP_188864	AtUGT83A1 NP_186859	AtUGT84A4 NP_193285
AtUGT85A1 NP_173656	AtUGT86A1 NP_181234	AtUGT87A1 NP_180576	AtUGT88A1 NP_850597
AtUGT89B1 NP_177529	AtUGT90A1 NP_179281	AtUGT91A1 AAD15567	AtUGTAtg19460 NP_567589
AtUGT Root AHL38881	AtUGT Root Atlg73160 AHL38881	AtUGT Root At5g59070 NP_200715	LuUGT712B1 AGD95009
LuUGT74S1 AGD95005	LuUGT74T1 AGD95008	LuUGT79B17 AFJ52975	LuUGT89B3 AGD95007
LuUGT94H1 AGD95006	RcUGT79B Ant XP_002523261	SiUGT71A9 BAF96582	SiUGT94D1 BAF99027
ZmUGT022266 NP_001150595	ZmUGT159404 NP_001148083	ZmUGT180283 NP_001140711	ZmUGT AIA 024131 NP_001105326
ZmUGT Ant 010987 NP_001149462	ZmUGT Ant 036409 NP_001148567	ZmUGT Ant 043295 NP_001132331	ZmUGT Ant 058314 NP_001149283
ZmUGT Ant 061321 NP_001150609	ZmUGT Ant 063550 NP_001148983	ZmUGT Ant 113794 NP_001131537	ZmUGT Ant 135722 NP_001147674
ZmUGT Ant 155911 NP_001148465	ZmUGT Ant 165390 NP_001105886	ZmUGT Ant 174192 NP_001147268	ZmUGT Ant 455075 ACG27746
ZmUGT Cis-ZN 117878 NP_001146547	ZmUGT Cis-ZO 110511 AAL92460	ZmUGT Cis-ZO 168474 NP_001105017	ZmUGT Cit 009125 NP_001148091
ZmUGT Cit 082249 NP_001147564	ZmUGT Cit 834303 NP_001148991	ZmUGT HQ 007795 NP_001148283	ZmUGT HQ 372068 NP_001130518
ZmUGT root 037545 NP_001136887	ZmUGT root 051683 NP_001159290	ZmUGT root 066067 NP_001140739	

**Tabla 12:** Listado de proteínas empleadas en el análisis filogenético de la familia ENOD93 y su número de acceso en el GenBank.

PaENOD93 ABN47005	JcENOD93 XP_012078085	EgENOD93 XP_010039609	BvENOD93 XP_010688054
TcENOD93 XP_007013368	GmN36a BAA02721	GmN36b BAA02722	GmN93 BAA02724
GmN70 BAA02723	GmN315 BAA02720	OsENOD93a BAA33814	OsENOD93b BAA33815
AgNt84 AAD00171	AgNt164 CAA69708	RcENOD B9SEN5	SrENOD2 CAA44939
PsENOD12 AAA33664	PvENOD40 S65772	MsENOD12 Q40361.1	

## 6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

### 6.1. qPCR

#### 6.1.1. Retrotranscripción y condiciones de reacción

La síntesis de ADNc se desarrolló a partir de 1 µg de ARN total, utilizando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems) para la retrotranscripción, siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl y posteriormente fue diluida 6 veces para su posterior incorporación a las reacciones de qPCR. Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 48 pocillos usando el equipo “Step One Real Time PCR System” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). En cada reacción se incluyó 1x Power SYBR® Green (Applied Biosystems) en un volumen total de 15 µl. La cantidad de ADNc y la concentración de cebadores empleada se ajustaron para cada uno de los experimentos como se detalla en la Tabla 13. Además se usaron las condiciones estándar de reacción que se muestran en la Tabla 14. Al final de la reacción se desarrolló la curva melting para confirmar la uniformidad del producto y que no se produjeron uniones inespecíficas.

**Tabla 13:** Concentración de cebadores y cantidad de ADNc empleados en cada uno de los estudios de qPCR.

Gen		Concentración de cebadores		
		Órganos	Enraizamiento brotes	Enraizamiento hojas
<i>CsACT2</i>	Referentes	900 µM	900 µM	300 µM
<i>CsELF1</i>	Referentes		900 µM	
<i>CsENOD93</i>	Diana	250 µM		250 µM
<i>CsERF1</i>	Diana	600 µM	850 µM	
<i>CsGH3.2</i>	Diana	800 µM		550 µM
<i>CsRLK</i>	Diana	250 µM		200 µM
<i>CsSCL1</i>	Diana	725 µM		600 µM
<i>CsSCL3</i>	Diana	200 µM		350 µM
<i>CsSHR1</i>	Diana	450 µM		650 µM
<i>CsSHR2</i>	Diana	250 µM		250 µM
<i>CsTUB</i>	Referentes	250 µM	300 µM	550 µM
<i>CsUBI3</i>	Referentes	275 µM		300 µM
<i>CsUGT</i>	Diana	250 µM		100 µM
<b>Cantidad de ADNc</b>		8.3 ng	10.8 ng	4.2 ng

**Tabla 14:** Condiciones para las reacciones de qPCR.

Ciclos	temperatura	Tiempo
1	95°C	10 min
40	95°C	15 s
	60°C	1 min



### 6.1.2. Diseño de cebadores

**Tabla 15:** Cebadores empleados en qPCR.

Gen	Proteína codificante	Nº de accesión	Secuencia cebadores (5'-3') Forward/Reverse	Tamaño amplicon
<i>CsACT2</i>	Actina 2	ID6828205	GCCCCACGAGCTGTGTTC/ TCTGGCCCATTCACAACCA	73 nt
<i>CsELF1</i>	Factor de elongación 1 alpha	ID2007208	TTGTGCCGTCCTCATTATTGACT/ TCACGGGTCTGACCATCCTT	75 nt
<i>CsENOD93</i>	Early nodulin 93	KX029085	GGCAGCCGTTGTTGCTACTA/ CGCTTGTGCAGTGTGATTGA	100 nt
<i>CsERF1</i>	Ethylene transcription factor 1	JF755969.1	CATAGAGGCATTGTTTCAGCGG/ CATGTTTCAGAAATCTCCCCCA	105 nt
<i>CsGH3.2</i>	Gretchen Hagen 3	KX029083	AAGGCCGAGTTGCTGACAAC/ GGCCCTCTTGAAATTGCAT	101 nt
<i>CsRLK</i>	Receptor-like protein kinasa	KX029086	GCAGCTAAACTTGGGAGAATC/ AATAGGTCCACTGAGCTCTTGCA	99 nt
<i>CsSCL1</i>	Scarecrow-like 1	DQ683579	CGCCTCCTATTCTGGGTGAGTA/ GCCAACCCATCACCAAAATG	118 nt
<i>CsSCL3</i>	Scarecrow-like 3	KX029081	CAGCAAGTTAGAACAAGCCATGT/ CCTTTAGCGAATAGAGCTTGGAAT	90 nt
<i>CsSHR1</i>	Short root 1	KX029082	AGATGGGCTCGGAGATTGC/ CCTCCTCAACAAAGCTCTCACA	90 nt
<i>CsSHR2</i>	Short root 2	KX029087	AGTCCACCCAGCAGAGCAAT/ ATGATCGGCTTGTCGATGTG	90 nt
<i>CsTUB</i>	$\beta$ -Tubulina	ID2842854	CTCGTGCTGTTCTCATGGATCT/ TGGCCGAAAACGAAGTTGTC	100 nt
<i>CsUBI3</i>	Polyubiquitina 3	ID3924917	AGGAATCAACCCTTCACCTTGTC/ GAACTCTCCACCTCCAAAGTGATG	100 nt
<i>CsUGT</i>	UDP-Glicosiltransferasa	KX029084	GGAACCTACTAGTGAAGGCATGCA/ ACGTAATCGGGTTCATATGTAGCA	105 nt

Los cebadores específicos para cada gen evaluado fueron diseñados empleando el programa Primer Express version 3.0. (Applied Biosystems) basándonos en las secuencias obtenidas mediante RACE. Los valores de expresión fueron normalizados frente a tres genes referentes de los cuatro que se muestran en la Tabla 13: Actina (ACT) (Soler *et al.*, 2008), Factor de elongación (ELF) (Marum *et al.*, 2012), Tubulina (TUB) (Porth *et al.*, 2005) y Polyubiquitina (UBI). Las secuencias de ACT, ELF y TUB se obtuvieron a partir de la base de datos de Fagaceae ([http:// www.fagaceae.org/](http://www.fagaceae.org/)) y la de UBI a partir de nuestra colección de ESTs. Para cada experimento seleccionamos los tres genes referentes que presentaban mayor estabilidad en cada material concreto. Todos los cebadores (Tabla 15) presentan una Tm de entre 58 y 60°C y su tamaño varía entre 18 y 24 nucleótidos (nt). La concentración de los mismos se ajustó en cada experimento de manera que la eficiencia de la reacción, testada usando una curva estándar para cada

pareja de cebadores, tuviera valores próximos al 100% (Tabla 13). Los ensayos se realizaron con tres replicados biológicos independientes y tres replicados técnicos para cada muestra.

### 6.1.3. Evaluación de los resultados y análisis estadístico

Los valores relativos de expresión de cada gen se obtuvieron mediante el método de comparación de Ct (Schmittgen y Livak, 2008). Todos los cálculos y normalizaciones se llevaron a cabo usando el programa DataAssist™ v3.0 software (Applied Biosystems).

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor. Cuando los datos presentan homogeneidad de varianzas (Estadístico de Levene) se empleó el test Duncan y se establecieron diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ . En aquellos resultados que no presentaban homogeneidad de varianzas, se utilizó t de Student, estableciendo diferencias significativas para  $P \leq 0,05$ .

Además, en los estudios de evaluación de la expresión génica durante la inducción del enraizamiento, se realizó el análisis univariante para la identificación de interacciones entre el tiempo y los tratamientos hormonales. Se consideró que los valores de expresión se deben a la interacción de ambos factores para valores  $P \leq 0,05$ .

## 6.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

### 6.2.1. Síntesis de las sondas

Para la generación de las sondas es necesario que las secuencias “molde” dispongan en los extremos de una secuencia promotora reconocible por las ARN polimerasas. El vector pCR®II presenta a cada lado de la región de inserción una secuencia promotora, para las enzimas SP6 y T7 ARN polimerasas, permitiendo la síntesis de ambas sondas (sentido y anti-sentido) a partir de una única secuencia, en función de la enzima utilizada. La señal de hibridación obtenida con la sonda sentido, que presenta la misma secuencia que el ARNm que se quiere localizar no será específica y en el caso de que dé lugar a alguna señal servirá como control. Por el contrario, la sonda anti-sentido generada, tiene una secuencia complementaria al ARNm que se quiere localizar, dando lugar a una señal de hibridación específica. Para ello se clonaron fragmentos génicos específicos de cada gen, evitando las regiones conservadas de las familias génicas, y las colonias seleccionadas se cultivaron en medio líquido, utilizando kanamicina A para la selección. A partir del cultivo se procedió a la extracción del plásmido empleando el kit “QIAprep® Spin Miniprep” (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Mediante PCR, empleando las mismas condiciones y componentes de la reacción de PCR que se emplearon para confirmar la presencia del inserto en el apartado 5.3. (Tabla 8) y utilizando 50 ng del plásmido, se obtuvo la secuencia molde para la síntesis de las sondas, conteniendo el inserto y las regiones necesarias para la retrotranscripción. Las sondas marcadas con digoxigenina, se generaron empleando el kit “DIG RNA labeling kit SP6/T7”, (Roche Biochemicals) y siguiendo las instrucciones del fabricante, siendo hidrolizadas parcialmente a fragmentos de un tamaño aproximado de 200 nucleótidos mediante un tratamiento alcalino para facilitar su penetración en las células.

### 6.2.2. Hibridación

El proceso de hibridación *in situ* se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Sánchez *et al.*, (1995). En una primera etapa, las secciones se sometieron a un pretratamiento para mejorar la permeabilidad de los tejidos para que penetre la sonda, así como una prehibridación para reducir la señal no específica. A continuación se realizó la hibridación de las secciones con las correspondientes sondas marcadas con digoxigenina, a 43°C durante toda la noche. Posteriormente las muestras fueron lavadas y tratadas con ARNasa A, para retirar el exceso de sonda y eliminar las uniones inespecíficas. Finalmente, la detección de la señal se llevó a cabo mediante el kit “DIG Nucleic Acid Detection” (Roche Biochemicals) que emplea anticuerpos anti-DIG conjugados a una fosfatasa alcalina, de este modo se produce un precipitado coloreado (violeta) que permite localizar la señal. Una vez terminado el proceso de hibridación, se deshidrataron las muestras mediante el lavado en una serie creciente de etanoles (70%, 96% y 99%) y se montaron para su visualización. Las fotos se realizaron empleando un microscopio de campo claro (Nicon) con cámara digital (Olympus).

## 7. MATERIAL VEGETAL

### 7.1 LÍNEAS DE CULTIVO

Se emplearon tres líneas de cultivo de plantas híbridas de chopo (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx. clone T89) como especie modelo. Dos de estas líneas, se establecieron a partir de dos eventos de transformación independientes, que incorporaron el promotor del gen *PtSHR1* fusionado al gen reportero GUS (SHR1PGG1A Y SHR1PGG5A). Como control, se evaluó también la respuesta fisiológica de la línea de fenotipo salvaje (WT). En la Figura 7 y 8 se muestran plantas de las tres líneas empleadas establecidas *in vitro* y tras su transferencia a condiciones *ex vitro*.



**Figura 7:** Plantas de chopo de las dos líneas transgénicas (SHR1PGG1A y SHR1PGG5A) y del fenotipo salvaje (wild type) al final del ciclo de micropropagación *in vitro* (seis semanas).



**Figura 8:** Plantas de chopo de las dos líneas transgénicas (SHR1PGG1A y SHR1PGG5A) y del fenotipo salvaje (wild type) a los 6 meses tras ser transferidas a tierra y aclimatadas en invernadero a partir de los brotes de cultivo *in vitro*.

## 7.2. MANTENIMIENTO DE LOS BROTES EN PROLIFERACIÓN

Para la propagación y mantenimiento de las líneas de chopo se empleó el medio MS cuya composición se detalla en la Tabla 2, con la concentración de macronutrientes reducida a la mitad, añadiendo como agente gelificante Difco-Bacto-Agar (0,7%). No se incluyó en el medio de cultivo ninguna fuente de azúcares ni reguladores de crecimiento. Se ajustó el pH del medio a 5,6 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

En la fase de proliferación, los brotes se mantuvieron en un régimen de subcultivo de 6 semanas. Para su multiplicación, se dividieron en segmentos de una longitud aproximada de 3 cm, manteniendo las yemas axilares intactas y las hojas completas, y se inocularon en medio fresco para comenzar un nuevo ciclo de crecimiento. Dado que para el cultivo de chopo no incorporamos ninguna fuente de carbono, es necesario mantener las hojas intactas para incrementar la capacidad fotosintética de los mismos. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas, con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad y con temperatura de 25°C durante las horas de luz y 18°C durante el periodo de oscuridad.

## 8. ENRAIZAMIENTO

Para evaluar la respuesta rizogénica del chopo se emplearon brotes de 6 semanas, al final de la fase de proliferación. En esta etapa, los brotes suelen alcanzar un tamaño de entre 6 y 8 centímetros, se dividieron en dos partes, utilizando la parte apical (2,5-3,5 cm) para los ensayos de enraizamiento y la parte basal para la proliferación y mantenimiento de las líneas de cultivo. Los ensayos de enraizamiento se realizaron empleado el medio MS<sup>1/2</sup>.

Para estudiar el efecto de compuestos que afectan a las vías de señalización hormonal de auxinas y giberelinas, se evaluó la respuesta rizogénica de los brotes cultivados en presencia de AIB (2 µM), NPA (5 µM) inhibidor del transporte polar de auxina, AG3 (2 µM) y PAC (5 µM), este último como inhibidor de la ruta de biosíntesis de las giberelinas. Además se evaluaron muestras control a las que no aplicamos ningún tratamiento.

### 8.1. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La respuesta rizogénica de los brotes de chopo se evaluó a los 30 días después de la aplicación de cada uno de los tratamientos. Para ello se evaluaron los siguientes parámetros: la cinética del proceso, el porcentaje de enraizamiento, el tiempo medio requerido para la



emergencia de las raíces, el número de raíces por brote, la longitud media de la raíz más larga, el porcentaje de brotes enraizados que desarrollan RLs, el porcentaje de brotes que presentaba necrosis apical y por último, el crecimiento de los brotes durante este proceso de enraizamiento en milímetros (RC (mm)). Los brotes de chopo control (sin tratamiento hormonal) solo detienen momentáneamente el crecimiento durante el proceso de enraizamiento, pero dado que este crecimiento se ve alterado por los tratamientos hormonales, se tomaron datos del crecimiento (mm) transcurridos 30 días. En este caso no se evaluó la presencia de callo basal ya que en el chopo no tiene lugar su formación en ninguno de los tratamientos.

Todos estos datos fueron sometidos al mismo análisis estadístico ya descrito en el apartado 2.5 de castaño. Para cada tratamiento se emplearon 12 explantos y se realizaron tres replicados biológicos.

## **9. MATERIAL RECOGIDO**

Como ya se describió en el apartado de castaño, para el análisis histológico y de expresión de los ensayos de enraizamiento de chopo, se recogió material procedente de los cuatro tratamientos hormonales evaluados (2  $\mu$ M AIB, 5  $\mu$ M NPA, 2  $\mu$ M AG3 y 5  $\mu$ M PAC) y de las muestras control sin tratamiento, en las 3 líneas de cultivo. Se recogió la zona basal de los brotes (1 cm) a las 24 horas, 7 y 14 días tras iniciar los tratamientos y además, se recogieron las raíces desarrolladas para el análisis de expresión mediante reacción histoquímica de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

## **10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN**

### **10.1. REACCIÓN HISTOQUÍMICA DE LA B-GLUCURONIDASA (GUS)**

Se evaluó la localización e intensidad de la actividad GUS tanto en el segmento basal de los brotes como en las raíces procedentes de los diferentes tratamientos hormonales. Los segmentos basales de los brotes y las raíces, una vez recogidos se sumergieron en acetona 90% durante 30 minutos a -20°C, después se lavaron en agua destilada y se incubaron con X-Gluc (Tabla 16) (Jefferson *et al.*, 1987). A continuación, para asegurar la total penetración del sustrato se les aplicó 30 minutos de vacío en frío, y a continuación se transfirieron a una



estufa a 37°C en condiciones de oscuridad durante toda la noche para que se desarrolle la coloración. Seguidamente, las muestras se lavaron en agua destilada, y se procedió a su deshidratación con una serie creciente de etanoles (20%, 30%, 50%) por un tiempo de 10 minutos cada uno. El siguiente paso fue la fijación en FAA durante 30 minutos (5% formaldehído / 5% ácido acético / 50% etanol) y posterior deshidratación en etanol (70%, 85%, 96%), con transferencia cada dos horas. Una vez deshidratadas totalmente fueron embebidas en resina LR-White, siguiendo las indicaciones del fabricante y empleando el acelerador para la polimerización. Finalmente estas muestras fueron cortadas empleando un micrótopo Reinchert-Jung, realizando secciones longitudinales de las raíces de 7 µm y secciones transversales de las bases de 10 µm.

**Tabla 16:** Composición de la solución de X-Gluc empleada en los ensayos de histoquímica de la β-glucuronidasa.

Compuesto	Concentración
X-Gluc	2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
EDTA pH7	10 mM
K-Ferricianida	0,5 mM
K-Ferrocianida	0,5 mM
Triton X-100	0,1 %



# Resultados





## A. CASTANEA SATIVA

### 1. CAPACIDAD RIZOGÉNICA

#### 1.1. INDUCCIÓN DEL ENRAIZAMIENTO EN BROTES

En este trabajo se evaluó la capacidad rizogénica de brotes juveniles de castaño, de la línea P2Rb, tras la aplicación de dos tratamientos con auxina. El primero de ellos se realizó mediante “dipping” que consiste en la inmersión de la parte basal del brote en una solución de 4,9 mM de AIB durante un minuto (procedimiento previamente descrito por Sánchez y Viéitez, 1991) y el segundo mediante la inclusión en el medio de cultivo de una concentración de 75  $\mu$ M de AIB durante 24 horas.

Al comparar ambos tratamientos no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de brotes enraizados al final del proceso (94 y 85%) ni en el tiempo requerido para la emergencia de las raíces, la cual tuvo lugar de forma casi simultánea en ambos casos a los 10 y 11 días de media tras la iniciación de los tratamientos. Sin embargo, el número de raíces aumentó significativamente en el tratamiento de “dipping”, llegando a duplicarse con respecto al de AIB 75  $\mu$ M (8 frente a 4). Como se muestra en la Figura 9, el patrón radicular también mostró diferencias notables entre ambos tratamientos. En los brotes tratados con AIB 75  $\mu$ M la emergencia de las raíces estaba muy focalizada en el callo basal (98%) mientras que, por el contrario, en los brotes sometidos al tratamiento de “dipping” muchas de las raíces (más del 50%) se desarrollaron a lo largo del tallo. Sin embargo, el tratamiento al que se sometieron los brotes no influyó en otros parámetros evaluados, como la longitud de las raíces y el desarrollo de RLs (Tabla 17).

Por otro lado, como se muestra en la Figura 9, el aspecto y el estado fisiológico de los brotes difirieron considerablemente al final del proceso, dependiendo del tratamiento aplicado. El tratamiento de “dipping” provocó mayor estrés en los mismos, que se reflejó en la pérdida de turgencia de sus hojas y el estado de senescencia general del brote. Por el contrario, los brotes tratados con AIB 75  $\mu$ M mostraron un aspecto más vigoroso, y aunque también presentaron un elevado porcentaje de brotes con necrosis de la yema apical, un 33.6% de los mismos fue

capaz de reemprender el crecimiento de otra yema axilar a lo largo del periodo evaluado (30 días). En ambos tratamientos los explantos son sometidos a un fuerte estrés que generó la pérdida de dominancia apical, detuvo el crecimiento y produjo la necrosis apical.

A pesar de que ambos tratamientos no provocaron diferencias en cuanto a la cinética del proceso de enraizamiento y al porcentaje de brotes enraizados, a la hora de obtener brotes viables que resistan el proceso de aclimatación hay que tener en cuenta la calidad del brote y del sistema radicular desarrollado. En este caso, cada tratamiento afectó favorablemente a uno de estos aspectos; los brotes tratados mediante “dipping” desarrollaron un número mayor de raíces pero también mayores síntomas de estrés. Por el contrario, el tratamiento con AIB 75  $\mu$ M produjo brotes con menor sistema radicular pero mayor vigor fisiológico y capacidad de reemprender el crecimiento.



**Figura 9:** Brotes de castaño de la línea P2Rb enraizados *in vitro* a los 30 días tras el tratamiento auxínico y cultivados en medio GD $\frac{1}{3}$ . (A) Brote tratado con AIB 4,9 mM durante un minuto mediante inmersión basal. (B) Brote tratado con AIB 75  $\mu$ M, incorporado en el medio de cultivo, durante 24 horas. La flecha muestra una yema axilar que está reemprendiendo el crecimiento.

**Tabla 17:** Efecto del tratamiento de AIB en la respuesta rizogénica y fisiológica de los brotes P2Rb.

	Tratamiento AIB	
	4,9 mM/1min	75 $\mu$ M/24h
Enraizamiento (%)	94,4 $\pm$ 3,2 a	85,0 $\pm$ 4,7 a
Emergencia (d)	11,3 $\pm$ 0,7 a	10,0 $\pm$ 0,6 a
Nº raíces	8,4 $\pm$ 0,9 b	4,3 $\pm$ 0,1 a
Nº RFC	4,6 $\pm$ 1,5 b	0,1 $\pm$ 0,0 a
Longitud (mm)	26,3 $\pm$ 1,8 a	29,3 $\pm$ 0,6 a
Raíces laterales (%)	93,9 $\pm$ 3,6 a	87,0 $\pm$ 3,8 a
Callo (%)	87,0 $\pm$ 4,9 a	96,3 $\pm$ 3,7 a
Necrosis (%)	53,7 $\pm$ 12,1 a	66,4 $\pm$ 12,1 a
RC (%)	0,0 $\pm$ 0,0 a	33,6 $\pm$ 12,1 b

Los datos representan valores medios  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos con 18 explantos cada uno. Para cada parámetro, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

## 1.2. EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN CON NPA EN LA CAPACIDAD RIZOGÉNICA DE LOS BROTES

Para el estudio del efecto del NPA en la capacidad rizogénica de castaño evaluamos la aplicación de 50  $\mu$ M de NPA durante 5, 8 y 30 días en los brotes P2Rb tratados con AIB. Como se muestra en la Tabla 18, en los brotes tratados mediante “dipping” la aplicación de NPA durante 5 y 8 días no alteró significativamente el porcentaje de enraizamiento pero retrasó la emergencia de las raíces (5 y 6 días, respectivamente). Este retraso fue todavía mayor (9 días) al mantener el tratamiento de NPA durante 30 días, reduciendo también la capacidad rizogénica de los brotes (94,4% vs 53,7%). Del mismo modo, al prolongar el tiempo de aplicación del NPA se observó una reducción en el número y longitud de las raíces, mientras que el porcentaje de raíces desarrolladas fuera del callo basal aumentó hasta alcanzar el 95%. Por el contrario, el NPA no afectó a la capacidad de desarrollo de RLs ni modificó otros aspectos fisiológicos con respecto a los brotes tratados exclusivamente con AIB, tales como el desarrollo de callo basal, la necrosis apical y la capacidad de los brotes de reemprender el crecimiento.

**Tabla 18:** Efecto del tiempo de aplicación de NPA (50  $\mu$ M) en la respuesta rizogénica y fisiológica de los brotes P2Rb tratados con AIB 4,9 mM/1min.

Tiempo (días)	Tratamiento NPA			
	0 d	5 d	8 d	30d
<b>Enraizamiento (%)</b>	94,4 $\pm$ 3,2 a	87,0 $\pm$ 2,0 a	94,3 $\pm$ 5,0 a	53,7 $\pm$ 1,9 b
<b>Emergencia (d)</b>	11,3 $\pm$ 0,7 a	16,0 $\pm$ 0,7 b	17,0 $\pm$ 0,6 b	19,8 $\pm$ 0,7 c
<b>N° raíces</b>	8,4 $\pm$ 0,9 b	6,6 $\pm$ 0,6 b	7,1 $\pm$ 0,9 b	3,8 $\pm$ 0,3 a
<b>N° RFC</b>	4,6 $\pm$ 1,5 a	5,0 $\pm$ 0,3 a	5,4 $\pm$ 1,1 a	3,6 $\pm$ 0,4 a
<b>Longitud (mm)</b>	26,3 $\pm$ 1,8 b	26,5 $\pm$ 2,1 b	23,5 $\pm$ 2,8 b	13,2 $\pm$ 1,3 a
<b>Raíces laterales (%)</b>	93,9 $\pm$ 3,6 a	93,6 $\pm$ 0,1 a	88,2 $\pm$ 6,5 a	76,7 $\pm$ 3,4 a
<b>Callo (%)</b>	87,0 $\pm$ 4,9 a	89,1 $\pm$ 1,9 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	90,7 $\pm$ 9,3 a
<b>Necrosis (%)</b>	53,7 $\pm$ 12,1 a	38,8 $\pm$ 12 a	54,8 $\pm$ 16,4 a	66,7 $\pm$ 3,4 a
<b>RC (%)</b>	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Los datos representan valores medios  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos con 18 explantos cada uno. Las diferentes letras, en cada parámetro, representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan y t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

En la Tabla 19 se muestran los resultados de la aplicación del NPA a los brotes tratados con AIB 75  $\mu$ M. La aplicación de NPA durante 5 días ya provocó una notable inhibición de la capacidad rizogénica, reduciendo el porcentaje de enraizamiento desde el 85 al 54%, llegando a suprimirse totalmente el enraizamiento de los brotes cuando prolongamos el tratamiento durante 30 días. Se observó una correlación directa entre el tiempo de exposición al NPA y la inhibición del enraizamiento, en términos de porcentaje de explantos enraizados y tiempo medio requerido para la emergencia de la primera raíz por explanto, así como en el número y



la longitud de las raíces. Al igual que ocurrió en los brotes tratados mediante “dipping”, el NPA no afectó a la capacidad de desarrollo de callo basal ni a la presencia de necrosis apical. El tratamiento con NPA también disminuyó la capacidad de los brotes de reemprender el crecimiento, quedando totalmente inhibida en los brotes tratados durante 8 y 30 días.

**Tabla 19:** Efecto del tiempo de aplicación de NPA (50  $\mu$ M) en la respuesta rizogénica y fisiológica de los brotes P2Rb tratados con AIB 75  $\mu$ M/24h.

Tiempo (días)	Tratamiento NPA			
	0 d	5 d	8 d	30 d
Enraizamiento (%)	85,0 $\pm$ 4,7 c	54,0 $\pm$ 8,1 b	40,0 $\pm$ 3,7 b	0,0 $\pm$ 0,0 a
Emergencia (d)	10,0 $\pm$ 0,6 a	17,0 $\pm$ 1,5 b	22,0 $\pm$ 1,3 c	-
N° raíces	4,3 $\pm$ 0,1 c	2,1 $\pm$ 0,2 b	2,9 $\pm$ 0,4 b	0,0 $\pm$ 0,0 a
N° RFC	0,1 $\pm$ 0,0 a	0,1 $\pm$ 0,0 a	0,4 $\pm$ 0,1b	0,0 $\pm$ 0,0 a
Longitud (mm)	29,3 $\pm$ 0,6 a	31,5 $\pm$ 1,8 a	22,5 $\pm$ 2,3 b	-
Raíces laterales (%)	87,0 $\pm$ 3,8 a	81,0 $\pm$ 5,9 a	55,6 $\pm$ 5,6 b	-
Callo (%)	96,3 $\pm$ 3,7 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	100,0 $\pm$ 0,0 a
Necrosis (%)	66,4 $\pm$ 12,1 a	76,7 $\pm$ 4,7 a	90,3 $\pm$ 5 a	-
RC (%)	27,8 $\pm$ 9,7 b	2,8 $\pm$ 2,8 a	0,0 $\pm$ 0,0 a	-

Los datos representan valores medios  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos con 18 explantos cada uno. Las diferentes letras, en cada parámetro, representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan y t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 20:** Análisis de la varianza de la interacción entre el tratamiento con AIB y el tiempo de exposición al NPA. Se establecieron diferencias significativas para  $P \leq 0,005$ .

Fuente de variación	g.l.	CM	F	Sig. (0,05)
<b>Enraizamiento (%)</b>				
Tratamiento AIB	1	5244,912	107,554	0,000
Tratamiento AIB	3	2670,792	54,768	0,000
Interacción	3	396,692	8,135	0,002
Error	16	48,766		
<b>Emergencia (d)</b>				
Tratamiento AIB	1	16,820	6,854	0,020
Tratamiento AIB	3	102,134	41,743	0,000
Interacción	2	13,791	5,620	0,016
Error	14	2,454		
<b>Longitud</b>				
Tratamiento AIB	1	14,931	1,565	0,229
Tratamiento AIB	3	640,322	67,097	0,000
Interacción	3	100,046	10,484	0,000
Error	16	9,543		

En ambos tratamientos de AIB, el NPA afectó negativamente a la respuesta rizogénica de los brotes, pero de forma diferente en cada uno de ellos. El efecto inhibitorio fue más acusado en el tratamiento con AIB 75  $\mu$ M, pero en ambos existe una correlación entre el tiempo de aplicación del NPA y la inhibición del proceso de EA. Además, se corroboró mediante el análisis de la varianza el efecto de la interacción entre los tratamientos de AIB y de NPA. La interacción de ambos factores fue significativa para el porcentaje de enraizamiento, el tiempo de

emergencia de las raíces y su longitud. El resto de parámetros no pudo ser evaluado al no presentar homogeneidad de varianzas (Tabla 20).

### 1.3. CAPACIDAD RIZOGÉNICA DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTOS

Con el fin de describir un sistema experimental en castaño, simple y alternativo al de brotes, para estudiar marcadores moleculares implicados en el proceso de inducción de RAs, se evaluó y comparó la capacidad rizogénica de tres tipos de explantos: brotes, hojas y secciones de hojas de la línea P2Rb (Fig. 10). En ensayos preliminares con hojas, se evaluaron diferentes tratamientos con AIB para determinar las condiciones óptimas para el EA y se seleccionó para este estudio el tratamiento con AIB 25  $\mu$ M durante 5 días en condiciones de oscuridad. La inducción en brotes se llevó a cabo, como ya se ha mencionado anteriormente, aplicando AIB 4,9 mM mediante “dipping”.

En la Tabla 21, se muestra que el porcentaje de enraizamiento de los brotes P2Rb y de las hojas procedentes de estos brotes fue similar, superior al 90%, mientras que en las secciones de hojas fue significativamente menor (69%). Esta reducción fue independiente del tipo de segmento empleado: apical, medio o basal (Fig. 10). Sin embargo, la emergencia de las raíces no se vio afectada por el tipo de explanto utilizado y tuvo lugar a los 11-12 días. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número medio de raíces desarrolladas en cada tipo de explanto, siendo los brotes los que desarrollaron un número mayor de raíces, 8 frente a 4 en las hojas completas y 3 en las secciones de hojas. Por el contrario, la longitud de las raíces fue significativamente mayor en hojas que en brotes y en secciones de hojas. Además se analizó el patrón de desarrollo de las raíces, diferenciando el número de raíces originadas en la parte basal de los explantos (donde se produce el desarrollo del callo originado por el efecto de corte) o fuera de esta área. En los brotes aproximadamente la mitad de las raíces emergieron a lo largo del tallo, mientras que en las hojas las raíces se originaron mayoritariamente (87 y 97%) en la zona del corte (Tabla 21 y Fig. 11).

El uso de hojas como explantos para llevar a cabo estudios del proceso de enraizamiento ofrece ciertas ventajas: 1) la focalización de la respuesta rizogénica en el área del peciolo, 2) el incremento del número potencial de muestras ya que por cada brote se obtienen de 3 ó 4 hojas, 3) reducción de la complejidad del tejido analizado y 4) exclusión de otros procesos de desarrollo que pueden tener lugar de forma simultánea en el brote como consecuencia del tratamiento auxínico.

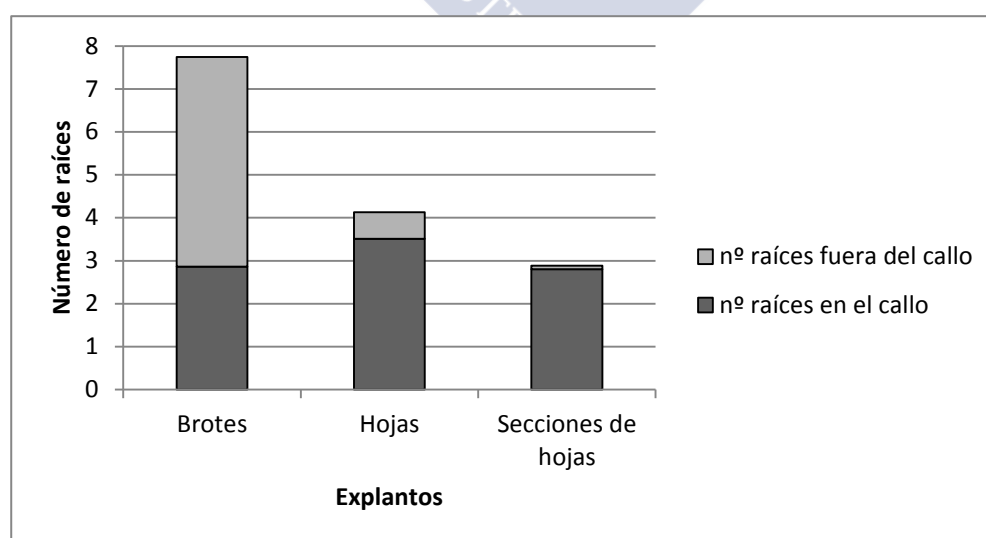


**Figura 10:** Respuesta rizogénica de los diferentes explantos de la línea P2Rb a los 30 días tras el tratamiento auxínico cultivados en medio GD $\frac{1}{3}$ . (A) Brote tratado con AIB 4,9 mM/1min. (B) Hojas y (C) Secciones de hojas tratadas con AIB 25  $\mu$ M/5d incorporado en el medio de cultivo.

**Tabla 21:** Respuesta rizogénica y fisiológica de los diferentes tipos de explantos. Los brotes se trataron con AIB 4,9 mM/1min y las hojas y las secciones de hojas con AIB 25  $\mu$ M/5d.

	Explantos		
	Brotes	Hojas	Secciones de hojas
<b>Enraizamiento (%)</b>	96,3 $\pm$ 1,9 b	92,6 $\pm$ 4,9 b	69,1 $\pm$ 5,0 a
<b>Emergencia (d)</b>	12,7 $\pm$ 0,2 a	12,1 $\pm$ 1,6 a	11,1 $\pm$ 0,2 a
<b>Nº raíces</b>	7,6 $\pm$ 0,3 c	4,1 $\pm$ 0,4 b	2,9 $\pm$ 0,2 a
<b>Nº RFC</b>	4,9 $\pm$ 1,1 b	0,6 $\pm$ 0,4 a	0,1 $\pm$ 0,0 a
<b>Longitud (mm)</b>	26,3 $\pm$ 1,0 a	42,1 $\pm$ 4,8 b	25,2 $\pm$ 0,8 a
<b>Raíces laterales (%)</b>	94,2 $\pm$ 0,1 a	91,6 $\pm$ 4,2 a	60,2 $\pm$ 12,9 a
<b>Callo (%)</b>	96,3 $\pm$ 1,8 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	90,1 $\pm$ 3,3 a

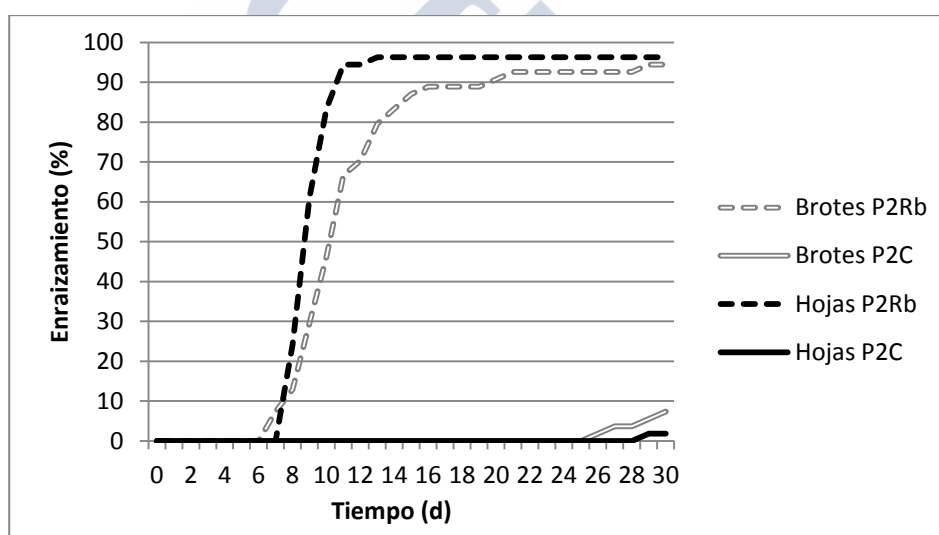
Los datos representan valores medios  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos con 18 explantos cada uno. Las diferentes letras, en cada parámetro, representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan y t de Student ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 11:** Número medio de raíces desarrolladas en la zona basal y fuera del callo.

### 1.3.1. Efecto del estado ontogenético de los explantos en la capacidad rizogénica

El estado ontogenético del individuo es uno de los factores determinantes de su capacidad rizogénica. Con el fin de comprobar si este sistema experimental de hojas permite evaluar la pérdida de capacidad rizogénica asociada a la maduración del individuo, se comparó la capacidad rizogénica de los brotes de castaño de las líneas P2Rb y P2C con la de hojas derivadas de ellos. Como se observa en la Figura 12, los diferentes explantos (brotes y hojas) de la misma línea de cultivo, es decir, con el mismo estado ontogenético (juvenil o adulto), exhiben una cinética de enraizamiento muy similar. El material adulto (línea P2C) alcanzó menos del 10% de enraizamiento, mientras que el material de la línea P2Rb, que conserva las características propias de individuos juveniles, superó el 90% de enraizamiento. La formación de raíces en las hojas de P2C fue ocasional y esporádica, en cuyo caso se desarrolló una sola raíz gruesa, corta y sin RLs (Fig. 13).



**Figura 12:** Efecto del estado ontogenético en la cinética del enraizamiento de brotes y hojas de las dos líneas del clon P2: P2Rb y P2C. La auxina en los brotes se aplicó mediante la inmersión basal en una solución de AIB 4,9 mM/1min, y en las hojas mediante la aplicación de AIB 25  $\mu$ M/5d en el medio de cultivo en condiciones de oscuridad.



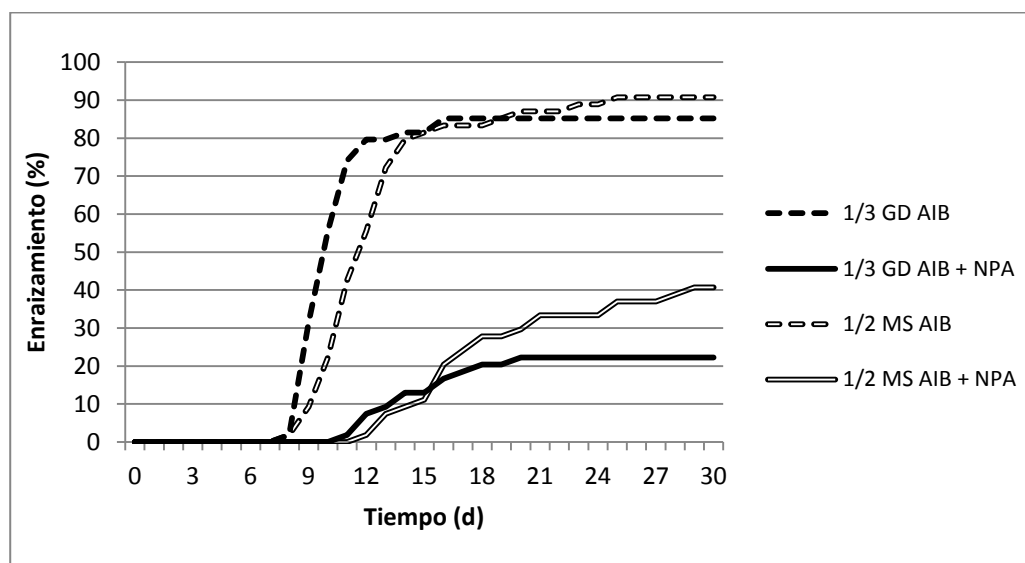
**Figura 13:** Efecto del estado ontogenético en la formación de raíces adventicias en hojas de castaño de la línea P2Rb (izquierda) y P2C (derecha) a los 30 días tras el tratamiento auxínico con AIB 25  $\mu$ M/5d.

Todo parece apuntar a que este sistema experimental de hojas, permitirá estudiar la respuesta fisiológica, bioquímica y molecular de individuos juveniles y adultos de castaño durante el EA.

#### **1.4. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL NPA EN LA CAPACIDAD RIZOGÉNICA DE HOJAS**

En base a los resultados anteriores, una vez fijada la concentración de auxina (AIB 25  $\mu\text{M}/5\text{d}$ ) para inducir la formación de raíces en hojas, evaluamos el efecto de dos medios minerales de cultivo ( $\text{GD}\frac{1}{3}$  y  $\text{MS}\frac{1}{2}$ ), así como el efecto de la aplicación de NPA (50  $\mu\text{M}/5\text{d}$ ) en la respuesta rizogénica de las hojas de la línea P2Rb. Como se puede ver en la Figura 14 y en la Tabla 22, el medio basal afectó al tiempo requerido para que tenga lugar la emergencia de las raíces y también a la formación de RLs. Al emplear el medio GD la emergencia de las raíces fue ligeramente más rápida (Fig. 14). En ambos casos, la presencia de NPA en el medio de cultivo redujo significativamente el porcentaje de enraizamiento, retrasó la emergencia de las raíces (entre 4 y 6 días), redujo el número de raíces desarrolladas (mostrando diferencias significativas únicamente cuando se empleó el medio MS) y su longitud ( $P \leq 0,01$ ).

En general las raíces se focalizaron en el área basal del peciolo, pero la morfología de las raíces fue bastante diferente; en el medio GD se desarrollaron raíces algo más cortas pero con más RLs, frente a raíces más largas y gruesas formadas en el medio MS (Fig. 15). Finalmente, en los explantos tratados con AIB y NPA simultáneamente y cultivados en el medio MS, tuvo lugar una pérdida de capacidad proliferativa ya que disminuyó ligeramente, aunque no significativamente, el porcentaje de explantos que desarrollaron callo basal en la región de corte. Ninguno de los parámetros evaluados se vio afectado por la interacción entre ambos factores ( $P \leq 0,05$ ) (Tabla 23). En base a estos resultados se seleccionó el medio GD para analizar el efecto del NPA en estudios posteriores, debido a que en este medio, el efecto inhibitorio en la capacidad rizogénica fue más acusado y a que los explantos presentaban mejor calidad del sistema radicular considerando la formación de RLs.



**Figura 14:** Efecto del NPA y el medio de cultivo sobre la cinética de enraizamiento de las hojas P2Rb. Las hojas se trataron con AIB 25  $\mu$ M/5d en presencia de 0  $\mu$ M NPA (AIB) ó 50  $\mu$ M NPA/5d (AIB + NPA) en oscuridad. Ambos tratamientos fueron evaluados en dos medios de cultivo (MS $\frac{1}{2}$  y GD $\frac{1}{3}$ ).



**Figura 15:** Efecto del medio de cultivo en el desarrollo del sistema radicular en hojas tratadas con AIB 25  $\mu$ M/5d en medio MS $\frac{1}{2}$  (A) o GD $\frac{1}{3}$  (B) en oscuridad. Seguidamente, las hojas fueron transferidas al mismo medio sin reguladores de crecimiento y bajo condiciones de fotoperiodo de 16h de luz.

**Tabla 22:** Efecto del medio de cultivo (MS $\frac{1}{2}$  o GD $\frac{1}{3}$ ) y del NPA en el enraizamiento de las hojas. La inducción se llevó a cabo mediante el tratamiento con AIB 25  $\mu$ M y en ausencia (AIB) o presencia de 50  $\mu$ M NPA (AIB + NPA) durante 5 días, en oscuridad.

Medio Tratamiento	GD $\frac{1}{3}$		MS $\frac{1}{2}$	
	AIB	AIB + NPA	AIB	AIB + NPA
Enraizamiento (%)	85,2 $\pm$ 3,7b	22,2 $\pm$ 3,2 a	90,7 $\pm$ 1,9 b	40,7 $\pm$ 4,9 a
Emergencia (d)	10,3 $\pm$ 0,2 a	14,1 $\pm$ 1,0 b	12,7 $\pm$ 0,6 ab	18,4 $\pm$ 0,3 c
Nº raíces	4,9 $\pm$ 0,3 ab	3,3 $\pm$ 0,3 a	5,9 $\pm$ 0,3 b	3,5 $\pm$ 0,6 a
Nº RFC	0,6 $\pm$ 0,2 a	0,7 $\pm$ 0,3 a	1,1 $\pm$ 0,4 a	1,1 $\pm$ 0,6 a
Longitud (mm)	44,0 $\pm$ 2,1b	24,2 $\pm$ 3,1 a	50,6 $\pm$ 1,6 b	24,2 $\pm$ 2,1 a
Raíces laterales (%)	97,6 $\pm$ 2,4 b	85,0 $\pm$ 7,7 b	14,0 $\pm$ 7,8 a	7,4 $\pm$ 7,4 a
Callo (%)	96,3 $\pm$ 1,8 a	88,9 $\pm$ 6,4 a	90,7 $\pm$ 4,9 a	63,0 $\pm$ 8,1 a

Los datos representan valores medios  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos con 18 explantos cada uno. Las diferentes letras, en cada parámetro, representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ( $P \leq 0,01$ ).



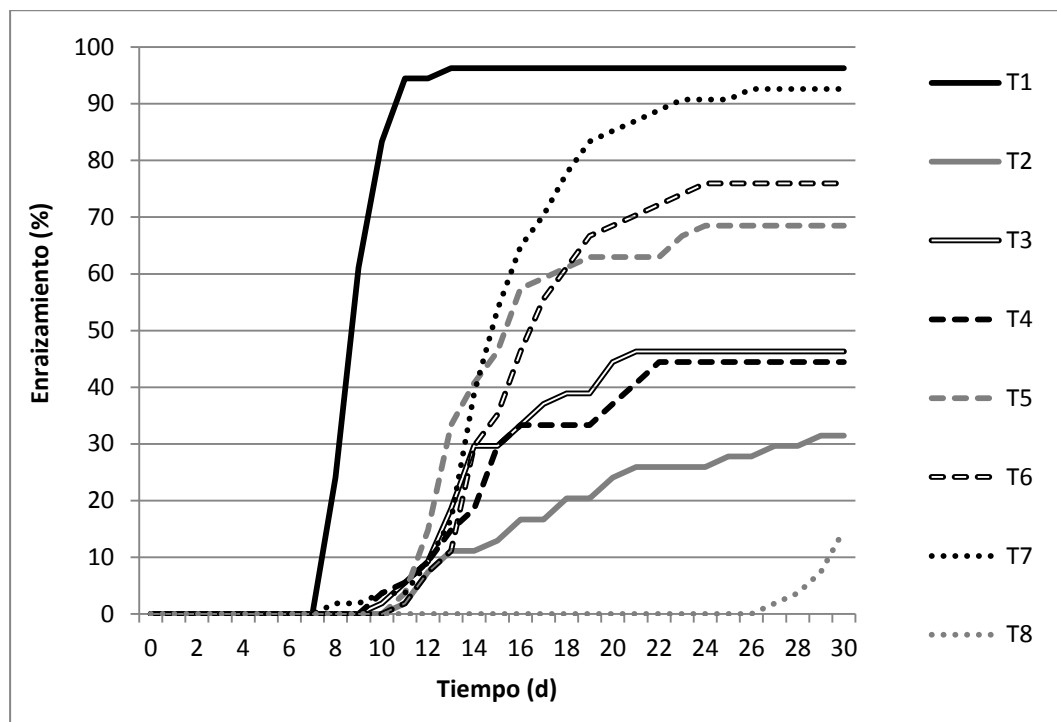
**Tabla 23:** Análisis de la varianza de la interacción entre el medio de cultivo y el tratamiento con NPA. Se establecieron diferencias significativas para  $P \leq 0,001$ .

Fuente de variación	g.l.	Enraizamiento (%)			Emergencia (d)			N° Raíces		
		CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)
Medio	1	193,857	10,560	0,012	34,442	31,961	0,000	1,050	1,606	0,241
Tratamiento	1	3938,541	214,550	0,000	66,411	61,626	0,000	11,741	17,952	0,003
Interacción	1	35,515	1,935	0,202	2,660	2,469	0,155	0,571	0,790	0,400
Error	8	18,357			1,078			0,654		
Fuente de variación	g.l.	N°RFC			Longitud (mm)			Raíces laterales (%)		
		CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)
Medio	1	0,725	1,518	0,253	33,233	1,517	0,253	11982,231	66,402	0,000
Tratamiento	1	0,002	0,005	0,945	1600,137	73,029	0,000	458,726	2,542	0,150
Interacción	1	0,001	0,002	0,964	31,850	1,454	0,262	5,679	0,031	0,864
Error	8	0,478			21,911			180,449		
Fuente de variación	g.l.	Callo (%)								
		CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)
Medio	1	528,548	4,131	0,077						
Tratamiento	1	629,077	4,916	0,057						
Interacción	1	199,390	1,558	0,247						
Error	8	127,960								

## 1.5. EFECTO DEL MOMENTO Y TIEMPO DE APLICACIÓN DEL NPA EN HOJAS

Con el fin de evaluar el efecto del NPA en la iniciación y desarrollo de los primordios radicales en las hojas, se aplicó NPA 50  $\mu\text{M}$  a diferentes tiempos tras la iniciación del tratamiento auxínico. Como se explicó en el apartado de material y métodos, el NPA fue aplicado durante 5 días, tanto iniciando este

tratamiento de forma simultánea con el de AIB (T2), como una vez transcurridas 24 (T3), 48 (T4), 72 (T5), 96 (T6) y 120 (T7) horas desde el inicio de la aplicación de AIB. Además, se realizó un tratamiento en el que tras la aplicación de AIB durante 5 días, se prolongó a 25 días el tiempo de exposición al NPA (T8).



**Figura 16:** Efecto del momento de aplicación de NPA (50  $\mu$ M) en la cinética del enraizamiento de hojas. La inducción del enraizamiento se realizó mediante la aplicación de AIB 25  $\mu$ M/5d en el medio y en oscuridad. En el tratamiento T1 o control, no se aplicó NPA. En los tratamientos T2, T3, T4, T5, T6 y T7 se aplicó NPA 50  $\mu$ M/5d simultáneamente al tratamiento con AIB (T2), a las 24h (T3), 48h (T4), 72h (T5), 96h (T6) y 120h (T7) tras la iniciación del tratamiento con AIB. En el tratamiento T8 se aplicó el NPA 50  $\mu$ M /25d tras el tratamiento de inducción con AIB 25  $\mu$ M/5d.

En la Tabla 24 y Figura 16 se muestran los resultados correspondientes a este experimento. Se observó un incremento paulatino en el porcentaje de enraizamiento a medida que se retrasaba el momento de aplicación del NPA, hasta alcanzar los valores máximos cuando el NPA se aplicó tras el tratamiento auxínico (T7), con un porcentaje similar al obtenido cuando los explantos fueron tratados exclusivamente con AIB (T1). La mayor inhibición del porcentaje de enraizamiento tuvo lugar al prolongar el tiempo de su aplicación (T8), así como con la aplicación simultánea de AIB y NPA durante 5 días (T2). El NPA provocó un retraso de entre 5 y 9 días, independientemente del momento de su aplicación y este retraso fue todavía mucho mayor cuando el tratamiento se prolongó a 25 días. En este caso la emergencia de las raíces se vio prácticamente bloqueada y

las pocas raíces que se desarrollaron lo hicieron a los 29 días tras iniciar el tratamiento.

**Tabla 24:** Efecto del momento de aplicación de NPA (50  $\mu$ M) en la respuesta rizogénica de hojas. La inducción del enraizamiento se realizó mediante la aplicación de AIB 25  $\mu$ M/5d en oscuridad. En el T1 o control no se aplicó NPA. En los tratamientos T2, T3, T4, T5, T6 y T7 se aplicó NPA 50  $\mu$ M/5d simultáneamente (T2), a las 24h (T3), 48h (T4), 72h (T5), 96h (T6) y 120h (T7) tras la iniciación del tratamiento con AIB. En el tratamiento T8 se aplicó el NPA durante 25 días tras el tratamiento de inducción con AIB 25 $\mu$ M/5d.

Tratamiento	Enraizamiento (%)	Emergencia (d)	N° raíces	N° RFC	Longitud (mm)	Raíces laterales (%)	Callo (%)
T1	96,3 $\pm$ 1,9 d	9,3 $\pm$ 0,3 a	5,8 $\pm$ 0,4 d	0,5 $\pm$ 0,0 a	36,9 $\pm$ 3,1 a	92,4 $\pm$ 3,8 a	92,6 $\pm$ 1,9 ab
T2	31,5 $\pm$ 4,9 a, b	17,8 $\pm$ 1,1 c	2,0 $\pm$ 0,3 a	0,8 $\pm$ 0,2 a	25,7 $\pm$ 7,8 a	77,8 $\pm$ 14,8 a	90,7 $\pm$ 4,9 ab
T3	48,1 $\pm$ 6,7 b	15,4 $\pm$ 0,5 b	4,1 $\pm$ 0,9 bc	1,0 $\pm$ 0,8 a	39,9 $\pm$ 3,5 a	100,0 $\pm$ 0,0 a	87,0 $\pm$ 4,9 ab
T4	44,4 $\pm$ 3,7 b	16,0 $\pm$ 0,5 bc	2,7 $\pm$ 0,5 ab	0,6 $\pm$ 0,2 a	31,3 $\pm$ 4,0 a	79,4 $\pm$ 5,1 a	72,2 $\pm$ 3,2 a
T5	68,5 $\pm$ 6,7 c	14,9 $\pm$ 0,7 b	3,4 $\pm$ 0,9 abc	0,4 $\pm$ 0,3 a	37,7 $\pm$ 5,8 a	87,5 $\pm$ 6,8 a	92,6 $\pm$ 3,7 b
T6	75,9 $\pm$ 3,2 c	16,4 $\pm$ 0,2 bc	3,4 $\pm$ 0,3 abc	0,4 $\pm$ 0,2 a	31,2 $\pm$ 2,0 a	82,4 $\pm$ 10,7 a	85,2 $\pm$ 1,9 ab
T7	92,6 $\pm$ 3,7 d	15,6 $\pm$ 0,5 b	4,9 $\pm$ 0,6 cd	1,2 $\pm$ 0,5 a	37,0 $\pm$ 3,7 a	80,6 $\pm$ 10,1 a	88,9 $\pm$ 8,5 ab
T8	14,8 $\pm$ 1,9 a	29,2 $\pm$ 0,2 d	2,2 $\pm$ 0,2 a	0,9 $\pm$ 0,4 a	4,5 $\pm$ 0,6 b	38,9 $\pm$ 20,1 a	83,3 $\pm$ 5,6 ab

Los datos representan valores medios  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos con 18 explantos cada uno. Las diferentes letras, en cada parámetro, representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan y t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

Los datos obtenidos para el resto de parámetros evaluados, a pesar de que algunos de ellos muestran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, no permiten establecer una correlación directa entre la presencia de NPA, el momento de su aplicación y la respuesta rizogénica de los explantos.

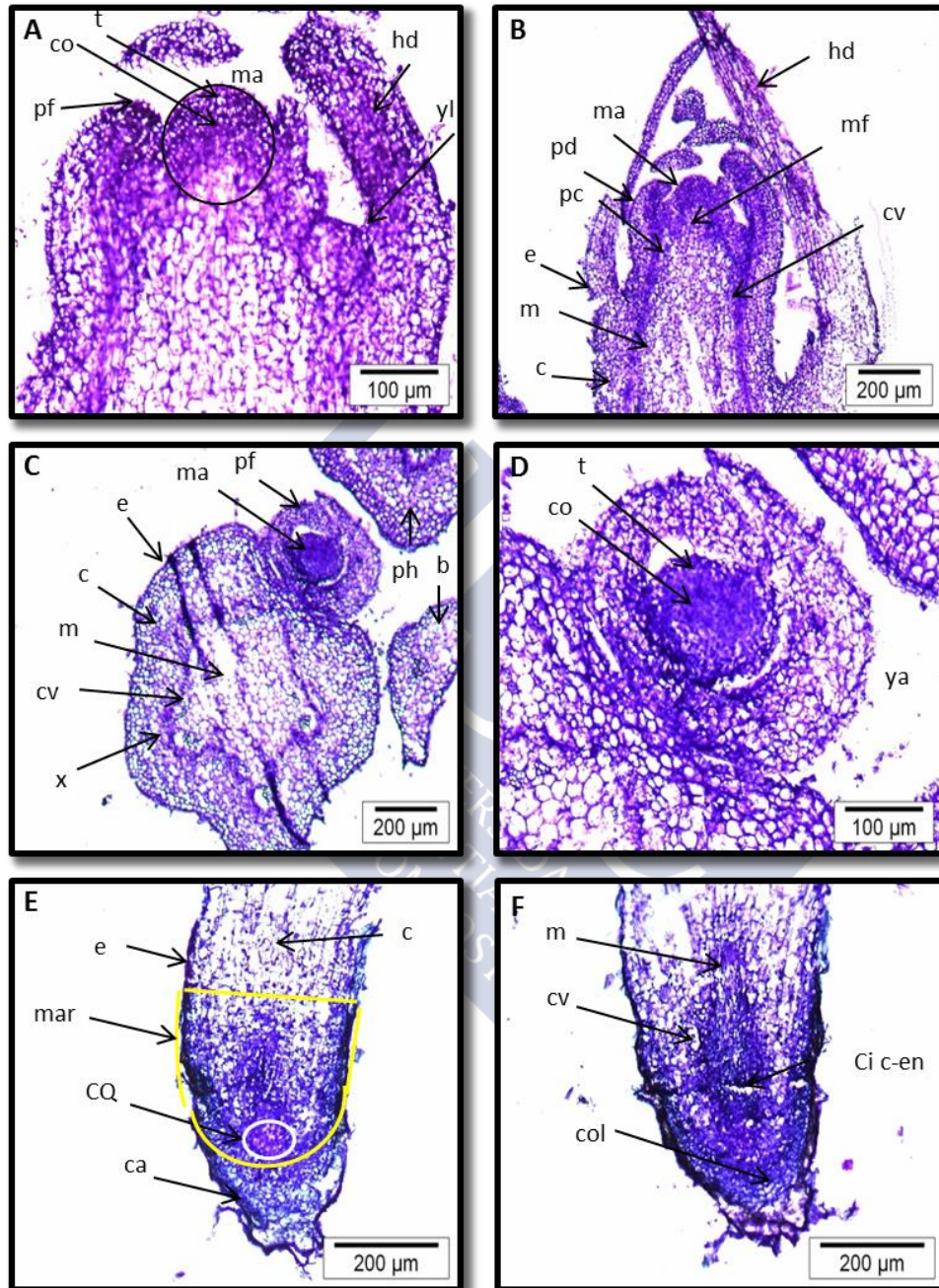
Por lo tanto, este experimento permitió establecer una correlación directa entre el porcentaje de hojas que forman RAs y el retraso de la aplicación de NPA. Además, estos resultados indican que el momento crítico para la inhibición de la inducción del EA son las primeras 48 horas, cuando tiene lugar la desdiferenciación celular y las primeras divisiones asimétricas que dan lugar a la formación de primordios radiculares.

## **2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE ÓRGANOS Y DEL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN CASTAÑO**

Como una primera aproximación, para el posterior análisis de la expresión génica y su localización, se realizó un estudio histológico de diferentes órganos y del proceso de EA tanto en brotes como en hojas.

En la Figura 17 se muestra la parte apical del brote (Fig. 17 A y B) y una yema axilar (Fig. 17 C y D) recogidos al final del periodo de proliferación de los brotes, y un ápice radicular (Fig. 17 E y F) recogido a los 30 días tras la inducción del enraizamiento. Los meristemos apical caulinar y axilar aparecen protegidos por varias capas de primordios foliares (pf) y hojas ya desarrolladas (hd) entre las cuales se localizan algunos primordios de yemas laterales (yl) que comienzan a desarrollarse. Las yemas axilares además presentan unas hojas especializadas llamadas brácteas (b). A nivel tisular el meristemo apical (ma), que corresponde al punto de crecimiento de los brotes, está formado por células meristemáticas que se organizan en dos capas claramente diferenciadas por los planos de división de sus células y el destino celular de las mismas. En la parte más externa se localizan varias hileras de células que constituyen la túnica (t), las cuales darán lugar a la protodermis (pd) y el córtex (c). La capa de células más interna, situada debajo de la túnica se denomina corpus (co) cuyas divisiones darán lugar al procambium (pc), a partir del cual se desarrollarán los nuevos haces vasculares y el meristemo fundamental (mf), que se diferenciará en el resto de tejidos del brote. En la Figura 17 B, debajo del meristemo caulinar y en la

sección transversal del brote (Fig. 17 C) se muestra la organización tisular del tallo que presenta una sucesión de capas concéntricas de tejidos diferenciados; la epidermis (e), el córtex (c), el cilindro vascular (cv) (formado por floema, cambium y xilema (x)) y la médula (m) en la zona más central.



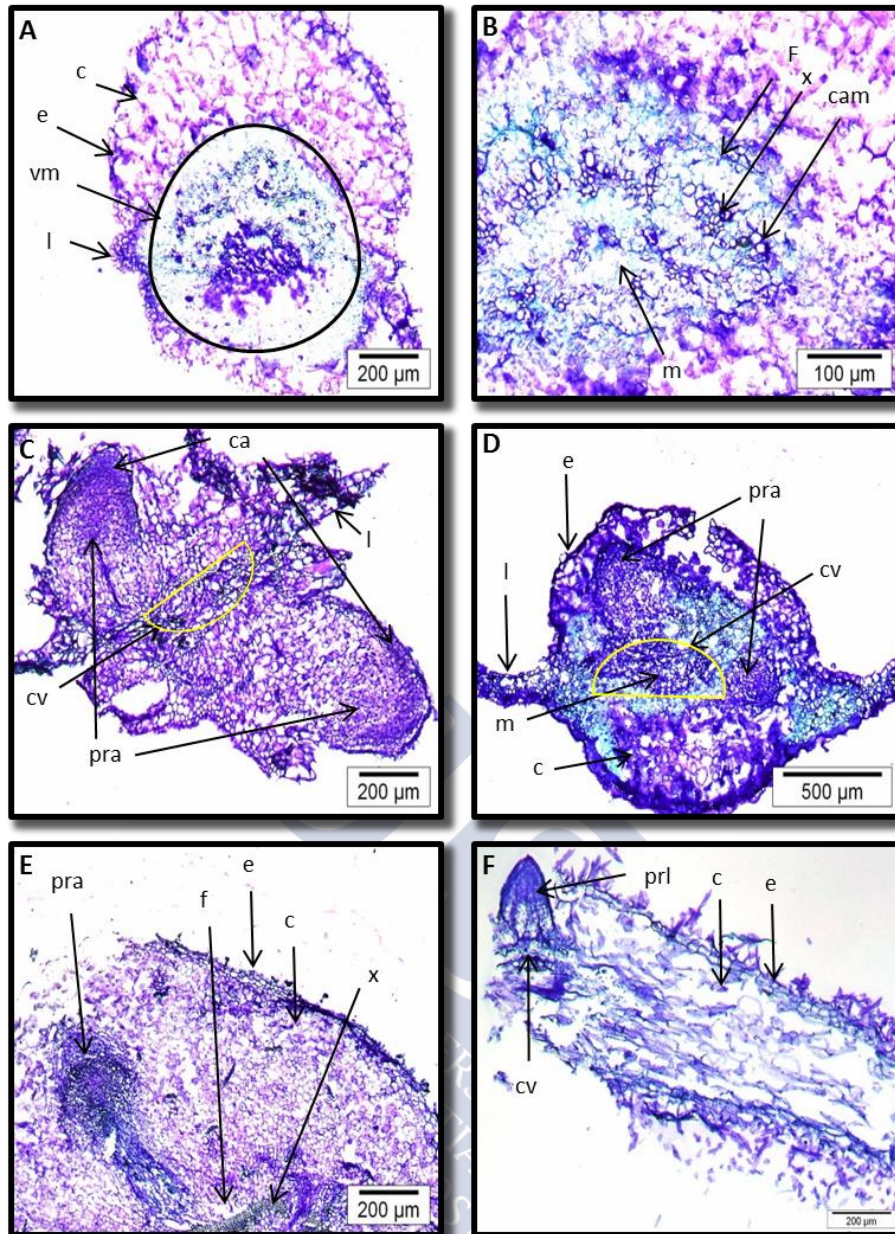
**Figura 17:** Meristemo apical del tallo (A, B), meristemo axilar (C, D) y radicular (E, F) de brotes de la línea P2Rb recogidos al final de la fase de multiplicación (A, B, C, D) o a los 30 días tras la inducción del enraizamiento (E, F). Criosecciones longitudinales (A, B, E, F) y transversales (C, D) de 10 μm teñidas con azul de toluidina. c: córtex, ca: caliptra, Ci c-en: células iniciales del córtex y la endodermis, co: corpus, col: columela, CQ: centro quiescente (delimitado con un círculo blanco), cv: cilindro vascular, e: epidermis, hd: hoja desarrollada, m: médula, ma: meristemo apical, mar: meristemo apical radicular (delimitado en color amarillo), mf: meristemo fundamental, pc: procambium, pd: protodermis, pf: primordios foliares, ph: peciolo hoja, t: túnica, x: xilema, ya: yema axilar, yl: yema lateral.



El ápice radicular (Fig. 17 E y F) presenta un patrón de distribución celular radial en anillos concéntricos formados por la caliptra (ca), la epidermis (e) y las células meristemáticas que darán lugar al resto de tejidos. En posición central subapical del meristemo apical radicular (mar) se encuentra el centro quiescente (CQ), que dirige el crecimiento de la raíz organizando las divisiones de las células que lo rodean. El CQ está rodeado de las células madre o iniciales y típicamente meristemáticas, las cuales mediante divisiones asimétricas, mantendrán el nicho de células madre y darán lugar al resto de tejidos. Hacia la zona de proliferación de la raíz, se origina el procambium (pc) que dará lugar a la estela de la raíz compuesta por el periciclo, los tejidos vasculares y la médula. Las células madre que rodean al CQ, situadas hacia el ápice de la raíz son las que darán lugar a las células iniciales del córtex, y la endodermis (Ci c-en), la epidermis y la columela (col). Hacia la zona basal (con los tejidos ya diferenciados), la raíz se compone de capas celulares concéntricas que forman la epidermis (e), el córtex (c), la endodermis, el periciclo y el cilindro vascular (cv).

Dado que en este trabajo se evalúan diferentes aspectos del EA, también se llevó a cabo un estudio histológico de este proceso. En la Figura 18 se muestran secciones transversales de hojas, tratadas con auxina sin formación de primordios (Fig. 18 A, B) y mostrando la formación de primordios (Fig. 18 C, D), de un brote con un primordio de RA (Fig. 18 E) y la sección longitudinal de una raíz con un primordio de RL (Fig. 18 F). El peciolo de la hoja presenta una organización tisular similar a la del tallo y en este caso, debido al tratamiento auxínico hay proliferación celular principalmente en la zona del córtex (Fig. 18 A, B). Los primordios de RAs, tanto en hojas (Fig. 18 C, D) como en brotes (Fig. 18 E), siguen el mismo proceso de desarrollo y se originan a partir de los mismos tipos celulares, células del cambium y/o células parenquimáticas interfasciculares. A medida que progresa el desarrollo de los primordios, estos mantienen la conexión con el sistema vascular a partir del cual se han iniciado. Como se muestra en la Figura 18, la estructura de los primordios de RLs (Fig. 18 F) y de RAs (Fig. 18 C, D, E) es similar, a pesar de originarse a partir de tipos celulares diferentes, ya que las RLs se forman a partir del periciclo.

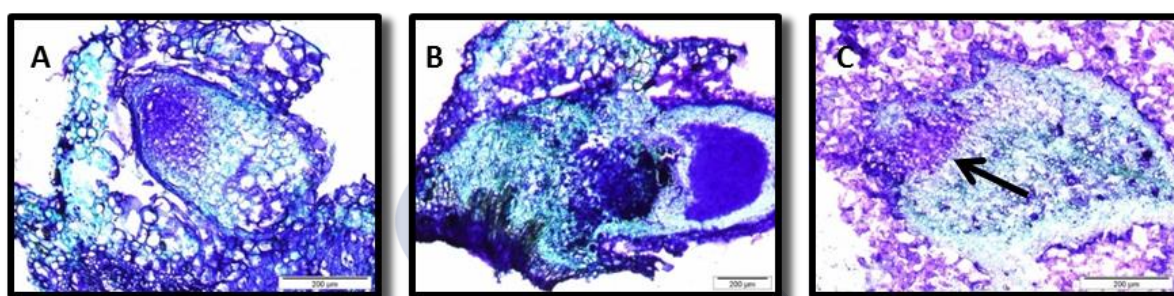




**Figura 18:** Secciones transversales de peciolo de hojas de la línea P2Rb (A, B, C, D) y de bases de brotes tratados con auxina (E) mostrando la presencia de primordios de raíz (C, D, E). Sección longitudinal de una raíz mostrando un primordio de raíz lateral (F). Las muestras fueron recogidas a los 10 días tras la inducción del enraizamiento y las criosecciones de 10 µm fueron teñidas con azul de toluidina. c: córtex, ca: caliptra, cam: cambium, cv: cilindro vascular, e: epidermis, f: floema, m: medula, l: limbo, pra: primordio de raíz adventicia, prl: primordio de raíz lateral, vm: vena media, x: xilema,

Finalmente se evaluó el efecto del momento de aplicación del NPA en el desarrollo de los primordios de raíz. Para ello se tomaron muestras a los 10 días tras el tratamiento con AIB (Fig. 19 A), tratadas con AIB y NPA simultáneamente (Fig. 19 B) y a las que se aplicó AIB durante 5 días y posteriormente fueron transferidas a un medio con NPA durante otros 5 días (Fig. 19 C). Como se ve en la Figura 19 A, transcurridos 10 días se pueden observar

primordios completamente desarrollados y emergiendo del córtex. Como ya se mencionó en el apartado 1.5, al aplicar AIB y NPA simultáneamente, la formación de raíces es infrecuente, sin embargo en los pocos casos en los que tiene lugar la aparición del primordio, este presenta un estado de desarrollo similar, aunque con cierto retraso, al de las muestras tratadas con AIB (Fig. 19 B). Por el contrario, cuando el NPA se aplica tras el tratamiento de AIB, tiene lugar un gran retraso en el desarrollo de los primordios, de forma que a los 10 días solamente se encontraron pequeños grupos de células meristemáticas o meristemoides comenzando a proliferar (Fig. 19 C).



**Figura 19:** Efecto del NPA 50  $\mu$ M sobre el desarrollo de primordios en hojas de castaño a los 10 días tras la iniciación del tratamiento de inducción con AIB (25  $\mu$ M/5d). Las muestras fueron tratadas con AIB (A); simultáneamente con AIB y NPA durante 5 días (B), y tratadas con AIB y posterior transferencia a NPA durante otros 5 días (C). Las criosecciones (10  $\mu$ m) fueron teñidas con azul de toluidina. En C, la flecha muestra un meristemoide incipiente.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS GÉNICAS

Como se ha señalado en Material y Métodos, empleando las técnicas de RACE y PCR y utilizando cebadores específicos de genes candidatos de otras especies, se obtuvieron las secuencias codificantes de los genes *CsSCL3*, *CsSHR1*, *CsGH3-2*, *CsUGT* y *CsENOD93* y las secuencias parciales *CsSHR2* y *CsSCRI*. Se trata de putativos genes implicados en procesos de desarrollo y en el EA, que serán caracterizados mediante el análisis de homologías, la identificación de dominios conservados, el establecimiento de relaciones filogenéticas y el análisis de su expresión.

#### 3.1. FAMILIA GRAS

Se han identificado cuatro secuencias génicas que codifican para proteínas de la familia GRAS, ya que en todas ellas, en el extremo carboxi-terminal se localizaron los cinco motivos característicos del dominio GRAS.

### 3.1.1. *Castanea sativa* SCARECROW-Like 3 (*CsSCL3*)

Se obtuvo una secuencia de 2011 pares de bases, que denominamos *CsSCL3* (*Castanea sativa* SCARECROW like 3). Esta secuencia codifica para una proteína predicha de 580 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 64,93 KDa y un punto isoeléctrico de 4,94. La secuencia nucleotídica, además de la parte codificante incluye 42 pb en la región 5'UTR y un fragmento de 224 pb en la región 3'UTR que contiene la cola de poli-A. En la Figura 20 se muestra la secuencia de nucleótidos, donde se localizan los cebadores utilizados en las reacciones de RACE y en el análisis de expresión mediante qPCR, así como los codones de iniciación y de terminación. En la misma figura, debajo de la secuencia de nucleótidos y en letras mayúsculas se muestra la secuencia deducida de aminoácidos. La proteína *CsSCL3* se caracteriza por presentar en la región amino-terminal, antes de que comience el dominio GRAS, una región rica en ácido aspártico. La posible estructura secundaria de la proteína, indica que en esa región se puede formar una cremallera de leucina con una hélice  $\alpha$  (EDKMRLKLQELERALLEDNDD). En la proteína se localizaron cuatro posibles puntos de N-miristoilación, diez de fosforilación de la proteína quinasa C (nueve de fosfoserina y uno de fosfotreonina), siete de fosforilación de la caseína quinasa II (cinco de fosfoserina y dos fosfotreonina), uno de N-glicosilación y uno de fosforilación de la tirosina quinasa.

```

1  gaagcagccttcctcctaactcagcaagttagaacaaagccatgtcttttagttagggt
                                     M S L V R A      6
60  gcagggctatctgcgacatcatatagaaattccaagctctattcgctaaaggggagtgat
    A G L S A T S Y R N S K L Y S L K G S D      26
121 gacagcccagcttgctccacccaaatattaggttctgataagcataagatatatgtg
    D S P S L S T Q I L G S D K H K T I Y V      46
181 actgattcttactccagtgaagttatgagaagtatttccttgactccccaacagaagaa
    T D S Y S S E S Y E K Y F L D S P T E E      66
241 cttatacagccatctaattctggcatttctggaaattcatttcaccaaattggcatctcc
    L I Q P S N S G I S G N S F H P N G I S      86
301 atgggcactcgaacccatttgacacttctttgatgtccctgagggcatcgtgatgcctat
    M G T R N P F D T S L M S L R H R D A Y      106
361 caatccaactttgaatcggattacttggaagccaaagcccagatccaatagactatgat
    Q S N F E S D Y L E S Q S P D P I D Y D      126
421 gaagataagatgagactgaagcttcaagaattggaagagcactgcttgaagataatgat
    E D K M R L K L Q E L E R A L L E D N D      146
481 gatgatgatgatgacgatgatgatgatgacatttttggtagatcacagcatggaaatt
    D D D D D D D D D D I F G T D H S M E I      166
541 gatggtgaatgggctgacccagttcacaacacattgctccatgactctcctaaggaatct
    D G E W A D P V H N T L L H D S P K E S      186
601 tcatctacagattcaaacctcagtagcatcagcagcaacaaggaagtatcacaagtatct
    S T D S N L S S I S S N K E V S Q V S      206
661 actcgtactcccagacaaatgctacttgattgtgctggtgcacttgacagtggaacatc
    T R T P R Q M L L D C A G A L A D G N I      226
721 atggaagcatcagctatgataaataacctccgaacatggtctcaatccagggggatcct
    M E A S A M I N N L R N M V S I Q G D P      246
781 cctcagaggattgcagcctacatggtggaaggtcttgacgctcgcatggcttctctggc
    P Q R I A A Y M V E G L A A R M A S S G      266
841 aaatgtctttataatgctctaaaatgcaaagagcccccttcttgaccgggcttgagcc
    K C L Y N A L K C K E P P S S D R L A A      286

```

```

901 atgcagatcctcttcgaggtgtgcccttgttttaaatggatttatggcagcaaattggt
    M Q I L F E V C P C F K F G F M A A N G 306
961 gcaatgatagaggcatttaagatgagaaaagagtcacatagtagatttcgatataaac
    A M I E A F K D E K R V H I V D F D I N 326
1021 caagggagtgcaatatataacactgatacaaacattgccaataacctagggaagccaccc
    Q G S Q Y I T L I Q T I A N N L G K P P 346
1081 catgtgagattaaactgggattgatgaccctgagtcattcaacggttcggtggaggccta
    H V R L T G I D D P E S I Q R S V G G L 366
1141 aaaattatttgacaaaagactggagaagctagcagaagcacttaaggtaccattttgagttc
    K I I G Q R L E K L A E A L K V P F E F 386
1201 cgagctgtggcatcaaaaacttcaataataactccatcaatgcttaattgtcgaccagga
    R A V A S K T S I I T P S M L N C R P G 406
1261 gaagcacttttgggtgaactttgcctttcaacttcaccacatgccagatgagagtgtgtca
    E A L L V N F A F Q L H H M P D E S V S 426
1321 acagtaaaccagcgagaccagcttcttcggatgggtaagagcctaaatccaaaacttggt
    T V N Q R D Q L L R M V K S L N P K L V 446
1381 actgttgttgaacaagatgtgaacacaaacacagctccatttttgcctagattcgttgaa
    T V V E Q D V N T N T A P F L P R F V E 466
1441 gcatacaattactattcagctgtttttgagtcctcttgatgcaactctcccaaggagagt
    A Y N Y Y S A V F E S L D A T L P R E S 486
1501 caagatagaatgaatgttgaaaggcagtgctggcacgggacattgtaaacatcggtgag
    Q D R M N V E R Q C L A R D I V N I V A 506
1561 tgtgaaggagaggagagatagagcggatgagtagcaggcaaatggagggcaaggatg
    C E G E E R I E R Y E V A G K W R A R M 526
1621 acaatggctggtttcacttcattcatgtccctgggacaaaagtgattgatacaatccaaat
    T M A G F T S C P M G P K V I D T I Q N 546
1681 ctaattagggagatttgtgacaggtacaagctgaagaaggaaatgggtgcacttcatttt
    L I R E Y C D R Y K L K K E M G A L H F 566
1741 ggggtgggaagaaaaaaacttgattgttgcttcagcatggaggtgatattgtatacatcatt
    G W E E K N L I V A S A W R 580
1801 tgagttactaatagcatgtttgttgcttggtattttgtaatatgtgtgagatcaagat
1861 gcaagctgatgtattatcttagttagaataagattttgttaattgttatcaagaagtga
1921 attgtccgaggatgattatgggattactgtttatctaacttcataaaggaatttcacct
1981 gaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2009

```

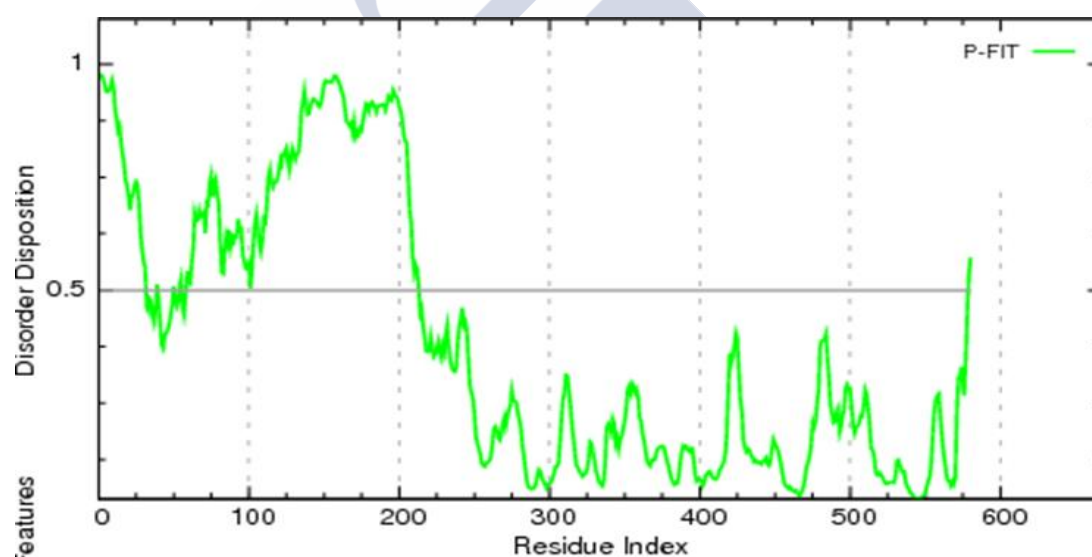
**Figura 20:** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del ADNc *CsSCL3*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja y los utilizados en los análisis de qPCR están subrayados. En rojo se indican los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TGA). Se representa en mayúsculas la secuencia aminoácidos, en amarillo una región rica en residuos de ácido aspártico, y en letras azules la cremallera de leucina.

El análisis de la secuencia mediante BLASTP reveló una alta homología de la secuencia *CsSCL3* con la codificada por el gen *AtSCL1* de *Arabidopsis thaliana*, que utilizamos de referencia para el alineamiento y la identificación de los residuos conservados. En la Tabla 25 se muestran las proteínas con mayor nivel de homología con nuestra secuencia, la mayoría de ellas denominadas como SCL1 en diferentes especies, entre ellas varias leñosas como el naranjo y el chopo. Cabe destacar, la alta homología con la secuencia “Chitin-inducible gibberellin-responsive protein” de ricino. En castaño, hemos denominado esta secuencia como *CsSCL3*, dado que ya se describió previamente otro gen de la familia GRAS con el nombre *CsSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007). Finalmente, se evaluó el desorden intrínseco de la proteína que se representa gráficamente en la Figura 21, se observa que los primeros 200 aminoácidos del extremo amino-terminal, que corresponden a la región previa al dominio GRAS, son los que presentan un mayor desorden.



**Tabla 25:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CsSCL3*. El valor “ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar.

Proteína	Ident	E-Valor
>gi 568837782 ref XP_006472900.1  PREDICTED: scarecrow-like protein 1-like [ <i>Citrus sinensis</i> ]	76%	0,0
>gi 224066759 ref XP_002302201.1  SCARECROW-LIKE 1 family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	75%	0,0
>gi 802559293 ref XP_012066104.1  PREDICTED: scarecrow-like protein 1 [ <i>Jatropha curcas</i> ]	77%	0,0
>gi 657949732 ref XP_008344600.1  PREDICTED: scarecrow-like protein 1 isoform X1 [ <i>Malus domestica</i> ]	76%	0,0
>gi 255558448 ref XP_002520249.1  Chitin-inducible gibberellin-responsive protein, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	78%	0,0
>gi 15218990 ref NP_173566.1  scarecrow-like protein 1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	64%	0,0



**Figura 21:** Representación gráfica del desorden intrínseco de la proteína CsSCL3

### 3.1.2. *Castanea sativa* **SHORT ROOT 1** (*CsSHR1*)

Empleando las técnicas de RACE y PCR, se aisló la secuencia codificante de otro gen de la familia GRAS. La secuencia identificada consta de 1484 pares de bases y codifica para una proteína predicha de 483 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 54,82 KDa y un punto isoeléctrico de 5,24. En base al análisis de homología, la denominamos *CsSHR1* (*Castanea sativa* **SHORT ROOT 1**). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se muestran en la Figura 22, donde también se indican los cebadores utilizados para el aislamiento de la secuencia y para los análisis de expresión mediante qPCR. En el extremo carboxi-terminal se

1	atggataccttggttaggctagtcagtccttcaatctgatcaatctttcaactcaagtaga	
	M D T L F R L V S L Q S D Q S F N S S R	20
61	acatcaagcagctctagatcctccagacaaaaccatcactaccacagaagacgaagaa	
	T S S S S R S S R Q N H H Y P Q E D E E	40
121	tgcttcaactttttcatggatgaagaagacttttctcgtcttcttctaataactactat	
	C F N F F M D E E D F S S S S S K H Y Y	60
181	ccttatcatcaacaacaacccaacccttcaaccactaccacccctactctcactcccacc	
	P Y H Q Q Q P N P S T T T T P T L T P T	80
241	accaccacaaacacaaacattagtagtaccccaactgacttgcgatttcaacttcaatttca	
	T T T N T N I S T P T D F D F N F E F S	100
301	tcaaactgggacccgaagctctcctcgaaaccgctcgagccattgctgacaagaacagc	
	S N W A P E A L L E T A R A I A D K N S	120
361	aatcgtgtccaacagctcatgtggatgctcaacgaactcagctctccttatgggtgacacc	
	N R V Q Q L M W M L N E L S S P Y G D T	140
421	gatcaaaagctcgttcttatttctcctcaagccttggttagtcgcatgactgactctggt	
	D Q K L A S Y F L Q A L F S R M T D S G	160
481	gagcgttggtatcgaaactctagcttccgcttctgacaaaacctgttccttcgagtcact	
	E R C Y R T L A S A S D K T C S F E S T	180
541	agaaaaacgggttttgaagttccaagaagtcagcccttgaccactttcggacatgtagct	
	R K T V L K F Q E V S P W T T F G H V A	200
601	tgtaatgggtgcaatcttggaagctctagaaggtgagcctaagttacacatagttgatttc	
	C N G A I L E A L E G E P K L H I V D F	220
661	agcaacacatattgtaccaatggcctactttgcttgaagccttagctacacgcactgac	
	S N T Y C T Q W P T L L E A L A T R T D	240
721	gaaacccgcacatctccatctcaccacagtggttagccacaaatcaggtggtgtgacccgct	
	E T P H L H L T T V V A T K S G G V A A	260
781	gtacaaaaagtaatgaaagagattggtaacagaatggaaaagttcgctagacttatgggt	
	V Q K V M K E I G N R M E K F A R L M G	280
841	gtgcctttcaaattcaatgtcatacaccatgttggtgatctttccgagtttaacttagct	
	V P F K F N V I H H V G D L S E F N L A	300
901	tccgaactagacatcaaagacgatgaagcttttagcaatcaactgtgtcaaccggttacac	
	S E L D I K D D E A L A I N C V N P L H	320
961	tccaccacaaccgttgacaaccgccgtgattatctaataatcaaactttcgaagattgcag	
	S T T T V D N R R D Y L I S N F R R L Q	340
1021	ccaaggataatcacagtgggtggaagaagaagctgatcttgatgttggttggtgatggggcc	
	P R I I T V V E E E A D L D V G V D G A	360
1081	gagtttgtgaaaggggttccaagagtgtttgagatggttttaggggtttatttgaggctttg	
	E F V K G F Q E C L R W F R V Y L E A L	380
1141	gaggagagcttttcaaaaaccagcaacgagcgttgatgctcgagcgaggtgctggtcga	
	E E S F S K T S N E R L M L E R G A G R	400
1201	gccatctggacttagtggttgcttcacatcagagtcgatcgagagcgtagtcagcg	
	A I V D L V A C A P S E S I E R R E S A	420
1261	gctagatgggctcgagattgcatgtaagtgggttcagtccaatttcttcagtgatgaa	
	A R W A R R L H V S G F S P I S F S D E	440
1321	gtttgtgatgatgtgagagctttgttgaggaggtacaaggaaggttggtcaatgacacag	
	V C D D V R A L L R R Y K E G W S M T Q	460
1381	tgctccgatgccgaatattcttggtggtggaaagatcagccgggtggtgtgggcccagtgca	
	C S D A G I F L A W K D Q P V V W A S A	480
1441	tggaggcctTgaacaactatggcgggtgcgtaccttctttacacgc	1484
	W R P	483

**Figura 22:** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del ADNc *CsSHR1*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja y los utilizados en los análisis de qPCR están subrayados. En rojo se indican los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TGA). Se representa en mayúsculas la secuencia de aminoácidos y en amarillo una región rica en residuos de treonina.

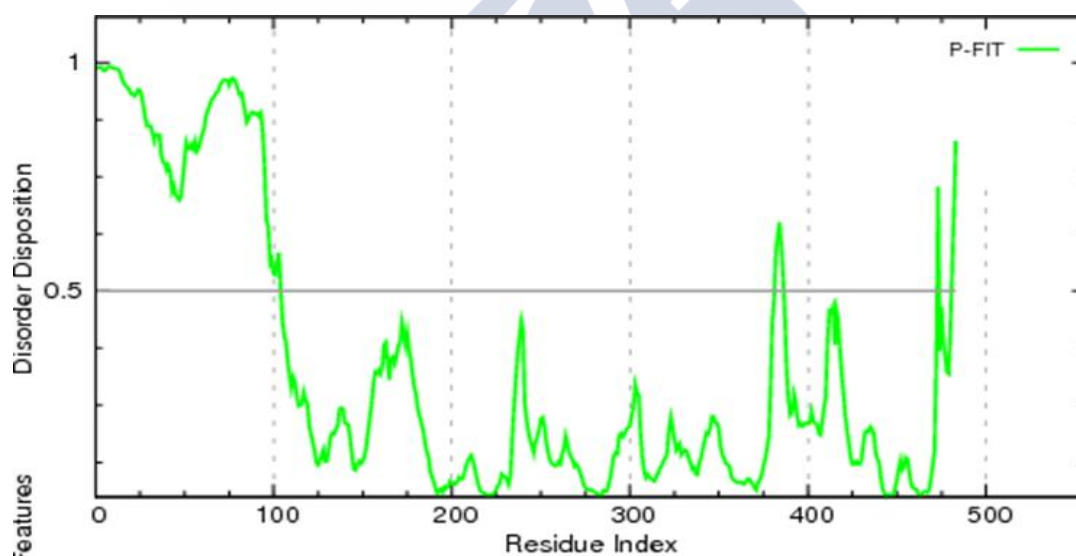
localizó el dominio GRAS, con los cinco motivos característicos conservados, aunque en este caso difieren ligeramente de lo descrito por Pysh (1999), como se detallará más adelante. En la secuencia proteica también se encontró una región rica en treonina en el extremo amino-terminal, así como cuatro posibles puntos de N-miristoilación, nueve de fosforilación de la



proteína quinasa C (siete de fosfoserina y dos de fosfotreonina), diez de fosforilación de la caseína quinasa II (tres de fosfoserina y siete de fosfotreonina), dos de N-glicosilación y uno de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc o GMPc.

**Tabla 26:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CsSHR1*. El valor “ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar.

Proteína	Ident	E-Valor
>gi 545585434 gb AET37154.2  GRAS family transcription factor [ <i>Quercus suber</i> ]	99%	0,0
>gi 685431527 gb AIO08306.1  GRAS family transcription factor SHR1, partial [ <i>Quercus ilex</i> ]	99%	0,0
>gi 731396933 ref XP_010652703.1  PREDICTED: protein SHORT-ROOT isoform X1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	82%	0,0
>gi 802645945 ref XP_012079411.1  PREDICTED: protein SHORT-ROOT [ <i>Jatropha curcas</i> ]	78%	0,0
>gi 568824103 ref XP_006466443.1  PREDICTED: protein SHORT-ROOT-like [ <i>Citrus sinensis</i> ]	99%	0,0
>gi 545585434 gb AET37154.2  GRAS family transcription factor [ <i>Quercus suber</i> ]	79%	0,0



**Figura 23:** Representación gráfica del desorden intrínseco de la proteína CsSHR1

Los resultados obtenidos mediante BLASTP (Tabla 26) evidenciaron el elevado grado de homología de la proteína deducida de nuestra secuencia con las codificadas por los genes aislados en otras fagáceas, como es el caso de *Quercus suber* (QsSHR) y *Q. ilex* (QiSHR1). Además, CsSHR1 mostró un 61% de homología con la secuencia proteica codificada por el gen AtSHR1 de *Arabidopsis thaliana*, previamente caracterizada y relacionada con la formación de la raíz. En la Figura 23 se muestra el análisis del desorden intrínseco de la

secuencia, con un alto grado de desorden en los 100 primeros aminoácidos del extremo amino terminal, en la zona previa al dominio GRAS.

### 3.1.3. *Castanea sativa* **SHORT ROOT 2** (*CsSHR2*)

Utilizando las técnicas ya descritas y los cebadores específicos, hemos obtenido una secuencia de 1195 pares de bases que denominamos *CsSHR2* (*Castanea sativa* **SHORT ROOT 2**), que corresponde a la secuencia parcial de una proteína de 398 aminoácidos.

```

1  atggacataactcttttccactccggaagaatcacccttcttccagtcacccagcagagc
   M D I T L F T P E E S P F F Q S T Q Q S 20
61  aatggtcaggcagcaatagatatgcatagtaacaatcagcctcaaaatagccacacatcg
   N G Q A A I D M H S N N Q P Q N S H T S 40
121  acaagccgatcatctgattctggtgtgctgcctagtgcatcaggtaaatgggcctcaaga
   T S R S S D S G V L P S A S G K W A S R 60
181  cttctcaaggagtgtgcacaagctatatccgagaaggactctagcaaaatccatcaactt
   L L K E C A Q A I S E K D S S K I H Q L 80
241  ctatggatggtgaatgagcttgcttcaccttatggagattgtgatcagaaattagcatct
   L W M L N E L A S P Y G D C D Q K L A S 100
301  tatttcttacaagctctattttgtaaggccacggagtcgggccaacgatgctacaaaaca
   Y F L Q A L F C K A T E S G Q R C Y K T 120
361  ctaacttcagtggctgaaaagagccactcctttgattcagctaggaattgataactaaag
   L T S V A E K S H S F D S A R K L I L K 140
421  ttccaagaggtgaagtccatggatgacttttggtcatgtagcttcaaatgggtgccattttg
   F Q E V S P W M T F G H V A S N G A I L 160
481  gaagcttttagaggggtgagaccaaacttcacataattgatataagcaataccctttgcacc
   E A L E G E T K L H I I D I S N T L C T 180
541  caatggcctacttttgctagaagctttggctacaagaaatgatgacacccctcattttaaag
   Q W P T L L E A L A T R N D D T P H L K 200
601  ctactgttggtgacaactagttcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtc
   L T V V V T T S S V K S V M K E V G Q R 220
661  atggaaaagtgtgcaagactaatggggagtcctctttgagtttgatgctataatgggggcta
   M E K F A R L M G V P F E F D A I M G L 240
721  aatcatttggcagagctcacaaaagaagtactaggtgttcaagaagatgaagctattgtg
   N H L A E L T K E V L G V Q E D E A I V 260
781  gtgaattgtattggggccttgagaagagcggaaagttagaggaaagaggagctgtgattcaa
   V N C I G A L R R A E V E E R G A V I Q 280
841  atgtttccaatcgcttaggcctcgagttgtgaccattgttgaggaagaagcagacttatca
   M F Q S L R P R V V T I V E E E A D L S 300
901  agctcaagagatgactttgtgaagtgtttgaagagtgcttaggttctatacattgtac
   S S R D D F V K C F E E C L R F Y T L Y 320
961  tttgagatgctagaggagagctttgtcccaacaagtaatgagagattattgttgagagg
   F E M L E E S F V P T S N E R L L L E R 340
1021  gagagctcaaggagcatagttagggttttggcttgatgatgaaaaaagtagtgaagaa
   E S S R S I V R V L A C D D E K S S E E 360
1081  gattgtgagagaagggagagagggagccaatggtctgagaggctcaaggaggcatttttca
   D C E R R E R G S Q W S E R L K E A F S 380
1141  ccagttgggttttagtgatgatgttggtgatgtcaaggcattgtctaaagaggt 1195
      P V G F S D D V V D D V K A L L K R 398

```

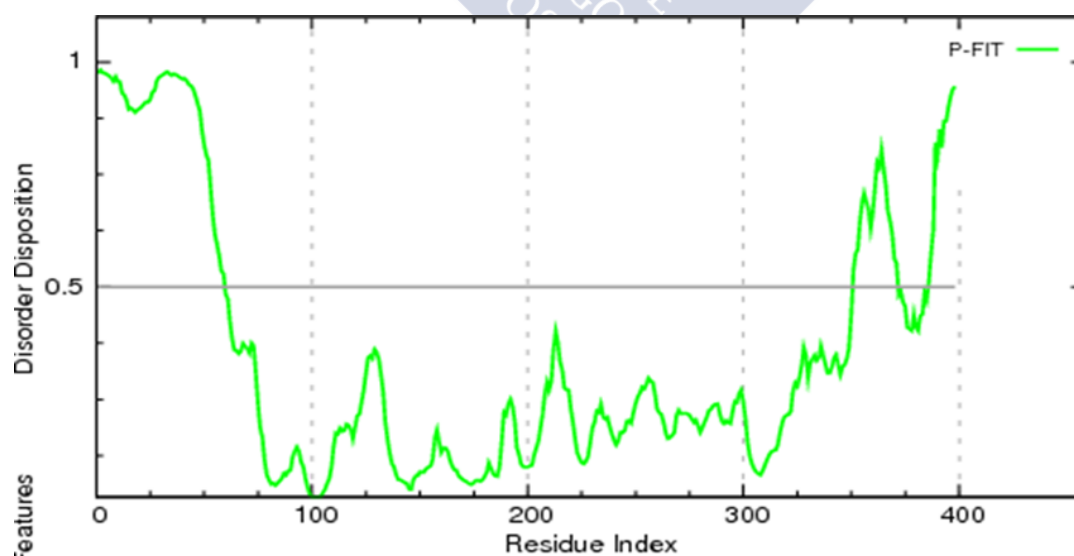
**Figura 24:** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del ADNc *CsSHR2*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja y los utilizados en los análisis de qPCR están subrayados. En rojo se indica el codón de iniciación (ATG). La secuencia de aminoácidos se muestra en letras mayúsculas.

La secuencia *CsSHR2*, está flanqueada por el codón de iniciación en el extremo 5'UTR, sin embargo no alcanza la región 3'UTR. En la Figura 24 se muestra la secuencia de

nucleótidos, donde se localizan los cebadores empleados para la obtención de la secuencia y los empleados en las reacciones de qPCR, así como el codón de iniciación. En la misma figura, también se incluye la secuencia deducida de aminoácidos, que contiene en el extremo carboxi-terminal el dominio GRAS característico de esta familia de proteínas, así como dos posibles puntos de N-miristoilación, diez de fosforilación de la proteína quinasa C (nueve de fosfoserina y uno de fosfotreonina) y once de fosforilación de la caseína quinasa II (seis de fosfoserina y cinco de fosfotreonina).

**Tabla 27:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CsSHR2* evaluados mediante BLASTP. El valor “Ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar.

Proteína	Ident	E-Valor
>gi 685431531 gb AIO08308.1  GRAS family transcription factor SHR2 [ <i>Quercus suber</i> ]	98%	0,0
>gi 685431529 gb AIO08307.1  GRAS family transcription factor SHR2, partial [ <i>Quercus ilex</i> ]	98%	0,0
>gi 645231491 ref XP_008222419.1  PREDICTED: protein SHORT-ROOT-like [ <i>Prunus mume</i> ]	82%	0,0
>gi 743883871 ref XP_011037138.1  PREDICTED: protein SHORT-ROOT-like [ <i>Populus euphratica</i> ]	81%	0,0
>gi 158142112 gb ABW20412.1  short-root [ <i>Pinus radiata</i> ]	63%	6e-151
>gi 15235646 ref NP_195480.1  protein SHORT-ROOT [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	55%	7e-131



**Figura 25:** Representación gráfica del desorden intrínseco de la proteína CsSHR1

El análisis mediante BLASTP confirmó que se trataba de otro gen *SHR* diferente al descrito previamente. Al igual que en el caso del gen *CsSHR1*, las dos secuencias con mayor grado de homología con *CsSHR2* pertenecen a *Q. suber* y *Q. ilex*. El grado de homología con la secuencia *AtSHR* es menor para *CsSHR2* que para *CsSHR1* (55 vs 61%) (Tabla 27). El análisis del desorden intrínseco de la proteína, mostró también una zona de aproximadamente 50 aminoácidos ubicada en el extremo amino-terminal con el mayor grado de desorden (Fig. 25). Como en las dos secuencias anteriores, se trata de la región previa al dominio GRAS característico de la familia.

### 3.1.4. *Castanea sativa* SCARECROW 1 (*CsSCR1*)

Finalmente, dentro de los genes caracterizados en este trabajo pertenecientes a la familia GRAS, se obtuvo una secuencia parcial de 1298 pares de bases, que denominamos *CsSCR1* (*Castanea sativa* SCARECROW 1) y que codifica 442 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína. En la Figura 26 se muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento *CsSCR1*, la ubicación de los cebadores utilizados, y la secuencia deducida de aminoácidos codificada por ese fragmento. La secuencia de aminoácidos identificada, presentó el dominio completo de la familia GRAS con los cinco motivos conservados y parte del extremo amino-terminal. En la secuencia proteica se identificaron nueve posibles puntos de N-miristoilación, seis de fosforilación de la proteína quinasa C (tres de fosfoserina y tres de fosfotreonina), ocho de fosforilación de la caseína quinasa II (tres de fosfoserina y cinco de fosfotreonina), dos de N-glicosilación, uno de fosforilación de la tirosina quinasa, uno de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc o GMPc y un punto de amidación. También se ha localizado una cremallera de leucina.

```

1  actctttccccctccctaccgcttcccctagccctaccgtccaagttcaattgcaagat
   T L S P L P T A S P S P T V Q V Q L Q D 20
61  gagcaacaacgacaggaactctccccctccagatactgcaatattaatgccgcctact
   E Q Q R Q E N S P P P D T A I L M P P T 40
121 actactactagtgcgaccacccaactaatattgtccatacaaccagagagaagaaagaa
   T T T S A T T P T N I V H T T R _ E K K E 60
181 gagatgcgtcagcagaagagggatgaacaaggcttacacctcctcacccttgctcttgcaa
   E M R Q Q K R D E Q G L H L L T L L L Q 80
241 tgcgcgccaagctgtttccgctgataattttgaggaagcaacaacatgcttctggagatt
   C A E A V S A D N F E E A N N M L L E I 100
301 tccgaactttcaacgccttttggtagctgcgcgcagcgtgtggctgcatatttctccgag
   S E L S T P F G T A A Q R V A A Y F S E 120
361 gccatgtccgcaagactggtgagctcgtgcctcggaatatatgggtcgctgcccattca
   A M S A R L V S S C L G I Y G S L P N S 140
421 ggcatagtattggccaaaagatggcttctgcctttcaagtattcaatggcatgagcccc
   G H S Y G Q K M A S A F Q V F N G I S P 160
481 ctgctcaagttttctcaccgagccaatcaggctatacaggaagcattcgagagggaggaa
   L V K F S H R A N Q A I Q E A F E R E E 180
541 agagttcacatcattgatctagacatcatgcaaggtctccagtggcctggtctctttcac
   R V H I I D L D I M Q G L Q W P G L F H 200

```

```

601 atccttgcttctagacccggaggtccgcctatgtgcgccctaccggcctaggaacctcc 220
    I L A S R P G G P P Y V R L T G L G T S
661 atggatgctctcgaggctactggcaagcgcttgctgtgatttcgccgagaaaattaggcctt
    M D A L E A T G K R L S D F A E K L G L 240
721 ccctttgagttcattcctctcgcagataaacccggcaatttggaccagagaggcttaat
    P F E F I P L A D K P G N L D P E R L N 260
781 gtcagcaagaggggaagccgcttgctgttcactgggttcagcattccctttacgatgtcact
    V S K R E A V A V H W L Q H S L Y D V T 280
841 ggttccgacaccaatatgctgtggcttttgcagagattggcaccaaaagtgtgacggtg
    G S D T N M L W L L Q R L A P K V V T V 300
901 gtagagcaggacctgagccacgcaggttcattcctgggaaggttggagggaatacac
    V E Q D L S H A G S F L G R F V E A I H 320
961 tactactcggcactgttcgattcactcggggcaagctacggagaggagagcgaggaaagg
    Y Y S A L F D S L G A S Y G E E S E E R 340
1021 cacgtggtagagcagcagttgctatcgagggagatccggaatgtgctggctgttgggggc
    H V V E Q Q L L S R E I R N V L A V G G 360
1081 ccatcgaggagtggagaggtgaagttccataactggagggagaagctgcagcagtcgggg
    P S R S G E V K F H N W R E K L Q Q S G 380
1141 ttcaagtccctctctttggctgggaatgctgccaccaggccaccctgcttcttggtag
    F K S L S L A G N A A T Q A T L L L G M 400
1201 ttcccttccgatggttacaccttggttgaggacaatggcaccctcaagcttggttgaaa
    F P S D G Y T L V E D N G T L K L G W K 420
1261 gaccttggcttgcactgcttctgctggaggccttt 1298
    D L C L L T A S A W R P 432

```

**Figura 26:** Secuencia parcial de nucleótidos y de aminoácidos deducida del ADNc *CsSCR1*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja (*CsSCR Rv1* y *CsSCR Rv2*). Se representa en mayúsculas la secuencia de aminoácidos y en amarillo una cremallera de leucina.

**Tabla 28:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CsSCR1*. El valor “Ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar.

Proteína	Ident	E-Valor
>gi 743941104 ref XP_011015033.1  PREDICTED: protein SCARECROW-like [ <i>Populus euphratica</i> ]	92%	0,0
>gi 802777724 ref XP_012090957.1  PREDICTED: protein SCARECROW [ <i>Jatropha curcas</i> ]	83%	0,0
>gi 225439035 ref XP_002264349.1  PREDICTED: protein SCARECROW [ <i>Vitis vinifera</i> ]	92%	0,0
>gi 694390723 ref XP_009370922.1  PREDICTED: protein SCARECROW 1-like [ <i>Pyrus x bretschneideri</i> ]	90%	0,0
>gi 657957631 ref XP_008370319.1  PREDICTED: protein SCARECROW-like [ <i>Malus domestica</i> ]	90%	0,0
>gi 15232451 ref NP_190990.1  protein SCARECROW [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	83%	0,0

El análisis de la secuencia aminoacídica mediante BLASTP, mostró que podría tratarse del gen *SCR* característico de esta familia génica, ya que presentó una alta homología con la proteína *AtSCR* caracterizada en *Arabidopsis thaliana*. El resto de proteínas que mostramos en la Tabla 28 son proteínas *SCR* o “tipo -*SCR*” de especies leñosas más o menos próximas filogenéticamente al castaño. En el momento de redactar esta memoria, no hemos conseguido

aislar la secuencia completa, por lo que de momento tampoco se han llevado a cabo otros estudios de expresión y caracterización.

### 3.1.5. Análisis filogenético

Con el fin de analizar más en detalle los genes identificados, se procedió al alineamiento de las secuencias proteicas con otros miembros de la familia GRAS, algunos de las cuales ya han sido caracterizados a nivel funcional. Como se muestra en la Figura 27, en el alineamiento se utilizaron las proteínas PeSCL, PtSCL1, CisSCL1, QsSHR, QiSHR1, QsSHR2 y QiSHR2 por ser las que presentaban un mayor nivel de homología con las cuatro secuencias identificadas en castaño tras realizar el análisis con BLASTP. Se incluyeron también las secuencias codificadas por los genes *AtSCR*, *AtSCL1* y *AtSHR* de *Arabidopsis*, dado que es en esta especie modelo en donde han sido caracterizados y estudiados en más profundidad (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Pysh *et al.*, 1999; Bolle, 2004) Este alineamiento mostró el alto grado de conservación del extremo carboxilo-terminal de las proteínas de la familia GRAS y de los aminoácidos característicos de cada uno de los dominios conservados que caracterizan dicha familia, incluso entre especies muy alejadas filogenéticamente como *Arabidopsis*. En la secuencia CsSCR, cabe destacar la presencia de la secuencia LXXLL, localizada al inicio del motivo “Leucine Heptad Repeat I” (LHR), una señal de localización nuclear de la proteína (NLS). Por otra parte, en CsSHR1 las secuencias VHIID y VRLTG características del motivo “VHIID”, al final, presentan sustituciones en varios de sus residuos. El motivo “Leucine Hepad Repeat II” está altamente conservado y sin peculiaridades reseñables en las 4 secuencias de castaño analizadas. Con relación al motivo PFYRE, en la proteína CsSHR1 no se encontró la secuencia característica del comienzo (LLVN), mientras que en CsSCL3 se localizó la inserción PDES, que aunque no está presente en todos los genes de la familia, cuando aparece está altamente conservada. Finalmente, se localiza el motivo SAW, de nuevo sin peculiaridades en las secuencias descritas. Por otro lado, el extremo amino-terminal es altamente divergente entre las cuatro proteínas caracterizadas. En las secuencias de *Arabidopsis* se identificaron 4 motivos conservados característicos de esta región y de estos grupos de la familia GRAS (los motivos IV y V en la secuencia *AtSCR*, el motivo XI en la secuencia *AtSCL1* y el motivo XII en la secuencia *AtSHR*).

Para finalizar, se construyó un árbol filogenético para poder incluir las secuencias caracterizadas en castaño dentro de alguno de los grupos en que se subdividió la familia GRAS en *Arabidopsis* (Bolle, 2004; Sun *et al.*, 2011). En el análisis incluimos las proteínas de *Arabidopsis* características de cada uno de estos subgrupos, algunas secuencias de otras especies ya identificadas y caracterizadas, y la secuencia de una proteína humana de la familia

STAT (HsSRC) que fue utilizada como outgroup. Como se muestra en el árbol filogenético que hemos elaborado (Fig. 28), la secuencia CsSCR1 se encuentra en el mismo subgrupo (SCR) que AtSCR, en el que se incluyen proteínas implicadas en la regulación de las divisiones asimétricas de las células iniciales del córtex y la endodermis durante el desarrollo de la raíz (Pysh *et al.* 1999). Las secuencias CsSHR1 y CsSHR2 se engloban en el mismo subgrupo (SHR) que AtSHR, asociado al control de la división celular y la especificación de la endodermis (Pysh *et al.*, 1999). Finalmente, CsSCL3 se engloba en el subgrupo PAT1, al igual que las proteínas AtSCL1 y AtPAT1 que inhiben la ruta de señalización de la luz del fitocromo A (Bolle *et al.*, 2000).

QsSHR	-----	
QiSHR1	-----	
CsSHR1	-----	
AtSHR	-----	
QsSHR2	-----	
QiSHR2	-----	
CsSHR2	-----	
CsSCL3	-----	
CisSCL1	-----	
PtSCL1	-----	
AtSCL1	-----	
CsSCR1	-----	
PeSCL	MMRKRMASEMMEVQSTITHQNHQRLSRGNIISGTVNYSLSISDNNNNDDNDVGMTRSTG	60
AtSCR	-----MAESGDFNGGQPPPHSPLRTTSSGS---SSSNRGPPPPPPPLVMVRKRL	48
QsSHR	-----	
QiSHR1	-----	
CsSHR1	-----	
AtSHR	-----	
QsSHR2	-----	
QiSHR2	-----	
CsSHR2	-----	
CsSCL3	-----	
CisSCL1	-----	
PtSCL1	-----	
AtSCL1	-----	
CsSCR1	-----	
PeSCL	ASSFTSCSNNNNINPSNPNSILYPVLNYHATTSMPLPSSTHLTAITSGGSASLSVSGFLSP	120
AtSCR	ASEMSSNPDYNNSSRPVSHLLDSNYNTVTPQQPPSLTAAATVSSQPNPP-----	100
QsSHR	-----MDTLFRLVSLQSDQSFNS-----SRT	21
QiSHR1	-----MDTLFRLVSLQSDQSFNS-----SRT	21
CsSHR1	-----MDTLFRLVSLQSDQSFNS-----SRT	21
AtSHR	-----MDTLFRLVSLQQQQSDSIITNQSSLRT	29
QsSHR2	-----MDITLFTPEESPFFQS-----	16
QiSHR2	-----FQS-----	3
CsSHR2	-----MDITLFTPEESPFFQS-----	16
CsSCL3	-----MSLVRAAGLSATSYRNSKLYSLKGSDDSPSLSTQILGSDKHKT	43
CisSCL1	-----MSLVSSPEPSATSYRKTKLYTLKSGHSSALS-TQAFGSDKHKM	43
PtSCL1	-----MSLVGPAELSATPYGNHKLKSLKGSNDNSGLS-AQIFCPDKRQN	43
AtSCL1	-MVEQTVVREHIKARVMSLVRSAP--SSYRNPKLYTLNENGNNNGVSSAQIFDPDRSKN	57
CsSCR1	-----	
PeSCL	TILSTNLITSCDDTHTHIHTQSQLPAVCGFSGLPFPFAEIKRNNIRSNAAADPPPGLIT	180
AtSCR	-----LSVCGFSGLPVFPSPDRGGRNVMM-----V	125
QsSHR	SSSSRSSRQ---NHHYPQED---EECFNFFMDEEDFSSSSSRH-----	58
QiSHR1	SSSSRSSRQ---NHHYPQED---EECFNFFMDEEDFSSSSSKH-----	58
CsSHR1	SSSSRSSRQ---NHHYPQED---EECFNFFMDEEDFSSSSSKH-----	58
AtSHR	STTTTGSPQTAYHYNFPQNDVVEECFNFMDDEEDLSSSSSHHNNHHN-----	76
QsSHR2	--TQQSNGQ-----AAIDMHSNNQPQ-----	35
QiSHR2	--IQQSNGQ-----AAIDMHSNNQPQ-----	22
CsSHR2	--TQQSNGQ-----AAIDMHSNNQPQ-----	35

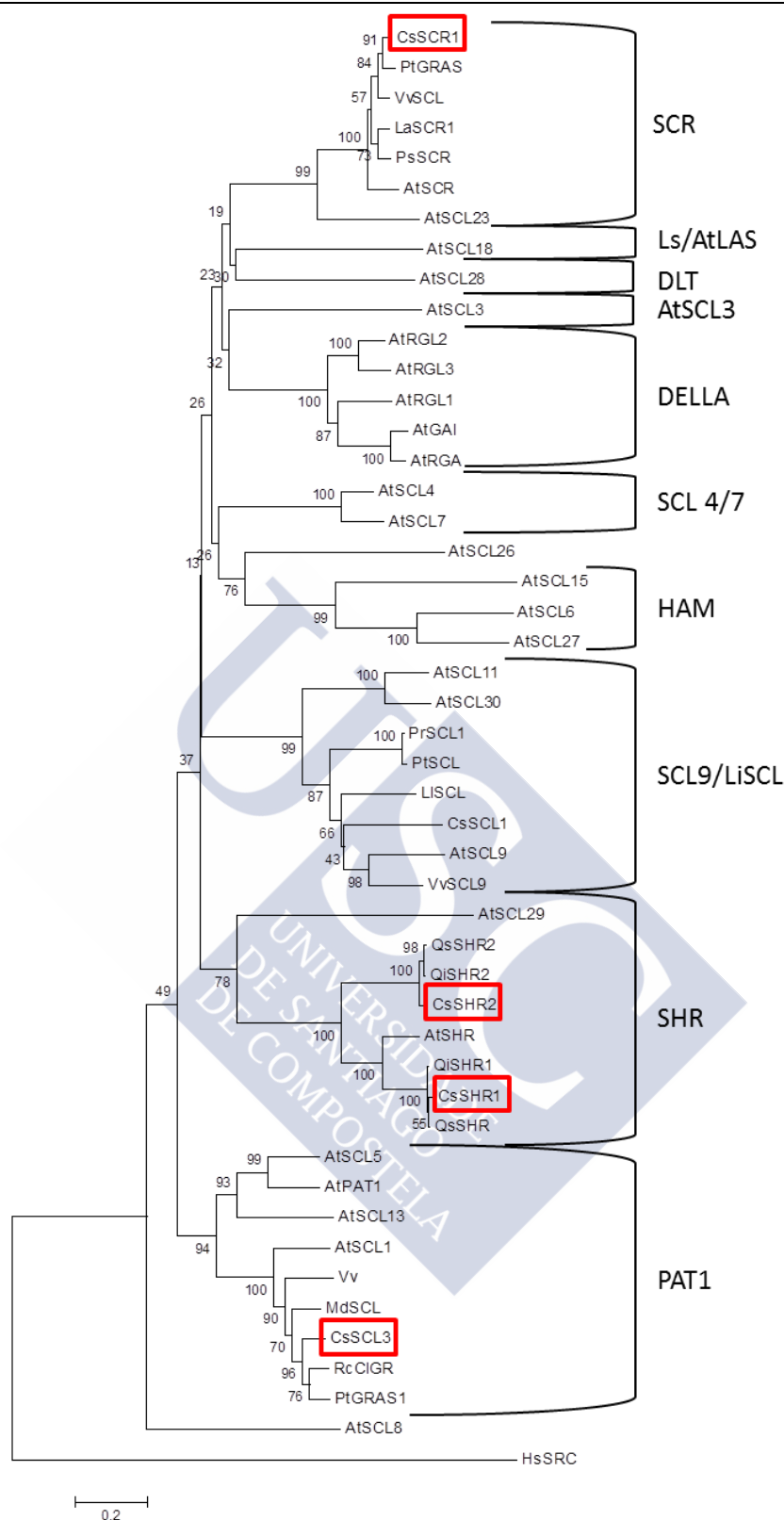


CsSCL3	IYVT-DSYSSSESYEKYFLDSPTEELIQ-PSNSGISGNSFHPNGIS-----	86
CisSCL1	MCQT-DSYSSSENYEDYILDSPTEELIH-PSSSADSGNSFHRQAPSH-----	88
PtSCL1	MYMT-DSYSSSESYEKYFLDSPTEELIQ-PSSSGISGNSAPPQGTSSY-----	88
AtSCL1	PCLTDDSYPSQSYEKYFLDSPTEDEFVQHPIGSGASVSSFGSLDSFPY-----	104
CsSCR1	-----	
PeSCL	TSITAPTTSTVASVSMEDFTSATAWIDGLIKDLLHTSTNVSIPLIQNVREIYPCNPNL	240
AtSCR	QPMQDSSSSSASP-----TVWVDAIIRDLIHSSTSVSIPQLIQNVREIIFPCNPNL	177
QsSHR	-----	
QiSHR1	-----	
CsSHR1	-----	
AtSHR	-----	
QsSHR2	-----	
QiSHR2	-----	
CsSHR2	-----	
CsSCL3	-----	
CisSCL1	-----	
PtSCL1	-----	
AtSCL1	-----	
CsSCR1	-----	
PeSCL	ASLLEYRLRSLTDPFIIPSNILPVERSRNKEAAAAVPLPLQIQRRYNQGHVNSGLTLDLD	300
AtSCR	GALLEYRLRSI-----MLLD	192
QsSHR	-----YYPYHQQQPNPSTTTTPT-----	77
QiSHR1	-----YYPYHQQQPNPSTTTTPT-----	77
CsSHR1	-----YYPYHQQQ-PNPSTTTTPT-----	76
AtSHR	NNPNTYYSPFTTPTQYHPATSSTPSSTAAAAA-----	108
QsSHR2	-----NSHTSTSR-----	44
QiSHR2	-----NSHTSTSR-----	31
CsSHR2	-----NSHTSTSR-----	44
CsSCL3	-----MGTRN-PFDTSLMSLRHRDAYQSNFESDYLESQSPDPIDYDEDKMRLKLQE	136
CisSCL1	QLRAGSSFPMAAQS-PLDSSFSMRRCHGYQPSFESGYLENQCPDPVDYDEDTMRLKLQE	147
PtSCL1	QLRKNLGPMSFPQDDPYDACTLTTPCDGYQFNSESDYLDIESPDPLNYDEYKMLKLFQE	148
AtSCL1	QSRPVLGCSMEFQLPLDSTSTSTRLLGDYQAVSYSPSMDVVE---EFDDEQMRSKIQE	160
CsSCR1	---TLSPPLTAS-----PSPTVQVQ-----LQDEQQRQENS	28
PeSCL	NIVSNSAPPVSSHVSHYSNMGPTPLICQPNIQQHLQPQIHLVHHDQHLQQQQMQQES	360
AtSCR	PSSSDPSPQTFEPLYQISNNPSPQQQQ-----QHQQQQQQHK	231
QsSHR	-----LTPTTTTNTNISTPTDFDF--	96
QiSHR1	-----LTPTTTTNTNISTPTDFDF--	96
CsSHR1	-----LTPTTTTNTNISTPTDFDF--	95
AtSHR	-----LASPYSSSGHHNDPSAFSIPQ	129
QsSHR2	-----SDSGVLP-----	51
QiSHR2	-----SDSGVLP-----	38
CsSHR2	-----SDSGVLP-----	51
CsSCL3	LERALLEDNDDDDDDDDDDIFGTDHSMEDGEWADPVHNTLLHDSPKESSSTDSNLSSI	196
CisSCL1	LERALLDDTVGDED----DDMFATIQNMEVEGEWPEPVQNVFPHDSPKESSSSDSILSSI	203
PtSCL1	LERALLNDNDED-----GMFGNSQSMEMDGEWSDPIQNGMLHDSPKESSSSDSSLSSI	201
AtSCL1	LERALLGDEDDK-----MVGIDNLMEIDSEWSYQNESEQHODSPKESSADSN-SHV	211
CsSCR1	P-----PPD-----TAILMPPTTTTSA-TTPTNIVHTTREKKE	60
PeSCL	PSSTSNVTPTILALNQGPQQQEQDQDQEKSSSAEAEQVSST-SPPSSSAAASRDKKE	419
AtSCR	PPP-----PPIQQQERENSSTDAPPQPETVTATVPAVQNTAE LERKE	276
<div style="text-align: center;"> <div style="background-color: #4a7ebb; color: white; padding: 5px; margin: 5px auto; width: 400px;">LEUCINE HEPTAD REPEAT I</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <span>←</span> <span style="border-bottom: 1px solid black; width: 200px; position: relative;"> <span style="position: absolute; right: -5px; top: -5px;">A</span> </span> <span>→</span> </div> </div>		
QsSHR	---NFEFSSN--WAPEALLETAQAADKNSNRVQQLMWMNLNELSSPYGDTDQKLASYFLQ	151
QiSHR1	---NFEFSSN--WAPEALLETARAADKNSNRVQQLMWMNLNELSSPYGDTDQKLASYFLQ	151
CsSHR1	---NFEFSSN--WAPEALLETARAADKNSNRVQQLMWMNLNELSSPYGDTDQKLASYFLQ	150
AtSHR	TPPSFDFSANAKWADSVLLEAARAFSDKDTARAQQILWTLNELSSPYGDTEQKLASYFLQ	189
QsSHR2	-----SASGKWASRLKECAQAISEKDSSKIHQLLWMLNELASPYGDCDQKLASYFLQ	104
QiSHR2	-----SASGKWASRLKECAQAISEKDSSKIHQLLWMLNELASPYGDCDQKLASYFLQ	91
CsSHR2	-----SASGKWASRLKECAQAISEKDSSKIHQLLWMLNELASPYGDCDQKLASYFLQ	104
CsSCL3	SSNKEVSQVSTRTPRQMLLDACAGALADGNIMEASAMINNLNRMVSIQGDPPQRIAYMVE	256
CisSCL1	SSNKEVSQVSPRTPKQLLIDCAATLSDGNIEEATTIINELRQMVSIGDPPQRIAYMVE	263
PtSCL1	SSNKEVSQVSPRTPRRLLFECANAISEGNIEKASTLINELRQLVSIQGDPPQRIAYMVE	261
AtSCL1	SSKEVVSQA---TPKQILISCARALSEGKLEEALSMVNELRQIVSIQGDPSQRIAYMVE	268
CsSCR1	EMRQQRDEQGLHLLTLLQLCAEAVSADNFEEANMMLLEISELSTPFGTAAQRVAYFSE	120
PeSCL	EMRQQRDEEGLHLLTLLQLCAEAVSADNFEEANKMLLEISELSTPFGTSAQRVAYFSE	479
AtSCR	EIKRQKQDEEGLHLLTLLQLCAEAVSADNLEEANKMLLEISQLSTPYGTSQRVAYFSE	336
	. * . * : : . . : : : : * * : : : :	

	LHRI		VHIID	
	B →			
QsSHR	ALFSRMTDSGERCYRTLAS--ASDKTCSFESTRKTVLKFQEVSPWTTFGHVACNGAILEA	209		
QiSHR1	ALFSRMTDSGERCYRTLAS--ASDKTCSFESTRKTVLKFQEVSPWTTFGHVACNGAILEA	209		
CsSHR1	ALFSRMTDSGERCYRTLAS--ASDKTCSFESTRKTVLKFQEVSPWTTFGHVACNGAILEA	208		
AtSHR	ALFNRMGTSGGERCYRTMVTAAATEKTCFESTRKTVLKFQEVSPWATFGHVACNGAILEA	249		
QsSHR2	ALFCKATESGQRCYKTLTS--VADKSHSFDSARKLILKFQEVSPWMTFGHVASNGAILEA	162		
QiSHR2	ALFCKATESGQRCYKTLTS--VADKSHSFDSARKLILKFQEVSPWMTFGHVASNGAILEA	149		
CsSHR2	ALFCKATESGQRCYKTLTS--VAEKSHSFDSARKLILKFQEVSPWMTFGHVASNGAILEA	162		
CsSCL3	GLAARMASSGKCLYNALKC-----KEPPSSDRLAAMQILFEVCPCKFKGFMAANGAMIEA	311		
CisSCL1	GLAARMAASGKFLYKALKC-----KEPPSSDRLAAMQILFEVCPCKFKGFMAANGAIEA	318		
PtSCL1	GLAARMAESGYLYKALKC-----KEPPSSDRLAAMQILFEICPCFKFKGFMAANGAMIEA	316		
AtSCL1	GLAARMAASGKFIYRALKC-----KEPPSDERLAAMQVLFVCPCKFKGFMAANGAILEA	323		
CsSCR1	AMSARLVSSCLGIYGLPN---SGHSYGQKMASAFQVFNGISPLVKFSHR-ANQAIQEA	175		
PeSCL	AMSARLVSSCLGIYATLPS---LPQSHQKMASAFQVFNGIGPFIKFSHFTANQAIQEA	535		
AtSCR	AMSARLLNSCLGIYAALPSR--WMPQTHSLKMVSFAQVFNGISPLVKFSHFTANQAIQEA	394		
	.. : * * :: . . : : * *. . . * * : **			
	VHIID			
QsSHR	LEGEPKLHIVDFSNTYCTQWPTLLEALATRTDETPHLRLTTVVATK--SGGVAAVQKVMK	267		
QiSHR1	LEGEPKLHIVDFSNTYCTQWPTLLEALATRTDETPHLRLTTVVATK--SRGVAAVQKVMK	267		
CsSHR1	LEGEPKLHIVDFSNTYCTQWPTLLEALATRTDETPHLRLTTVVATK--SGGVAAVQKVMK	266		
AtSHR	VDGEAKIHIVDISSTFCTQWPTLLEALATRSDDTPHLRLTTVVVANKFVNDQTASHRMMK	309		
QsSHR2	LEGETKLHIIDISNTLCTQWPTLLEALATRNDDTPHLKLTVVVTTS-----TVKSVMK	215		
QiSHR2	LEGETKLHIIDISNTLCTQWPTLLEALATRNDDTPHLKLTVVVTTS-----TVKSVMK	202		
CsSHR2	LEGETKLHIIDISNTLCTQWPTLLEALATRNDDTPHLKLTVVVTTS-----SVKSVMK	215		
CsSCL3	FKDEKRVHIVDFDINQGSQYITLIQTIANNLGKPPHVRLTGIDDP-----SIQRSVGGGL	367		
CisSCL1	FKGEKRVHIVDFDINQGSQYITLIQTIASLPGNRPHRLRTGVDDPE----SVQRLVGGGLQ	374		
PtSCL1	FKGERRVHIVDFDINQGSQYITLIQTLANHQGLPHRLRTGVDDPE----SVQRPVGGGLR	372		
AtSCL1	IKGEEEVHIVDFDINQGNQYMTLIRISIAELPGKRPRRLRTGIDDP----SVQRSIGGLR	379		
CsSCR1	FEREERVHIVLDIMQGLQWPGLFHILASRPGPPYVRLTGLGTSM-----DALE	225		
PeSCL	FEREERVHIVLDIMQGLQWPGLFHILASRPGPPYVRLTGLGTSL-----EALQ	585		
AtSCR	FEKEDSVHIVLDIMQGLQWPGLFHILASRPGPPHVRRLTGLGTSM-----EALQ	444		
	.. * :*:*. . * : * : * . * :*: * : . . : .			
	LEUCINE HEPTAD REPEAT II			
	A → B →			
QsSHR	EIGNRMEKFARLMGVPFKFNVIHHVGDLESEFNLALELDIKDDEALAINCVNTHST----	323		
QiSHR1	EIGNRMEKFARLMGVPFKFNVIHHVGDLESEFNLALELDIKDDEALAINCVNTHST----	323		
CsSHR1	EIGNRMEKFARLMGVPFKFNVIHHVGDLESEFNLALELDIKDDEALAINCVNTHST----	322		
AtSHR	EIGNRMEKFARLMGVPFKFNVIHHVGDLESEFDLN-ELDVKPDEVLAINCVGAMHGI----	364		
QsSHR2	EVGQRMKEFARLMGVPFEFNAIMGLNHLAELTKE-VLGVQEDEAIVVNCIGALRRV----	270		
QiSHR2	EVGQRMKEFARLMGVPFEFNAIMGLNHLAELTKE-VLGVQEDEAIVVNCIGALRRV----	257		
CsSHR2	EVGQRMKEFARLMGVPFEFDAIMGLNHLAELTKE-VLGVQEDEAIVVNCIGALRRV----	270		
CsSCL3	IIGQRLEKLAELKVPFEFRAVASK---TSIITPSMLNCRPGEALLVNFAFQLHHMPDES	424		
CisSCL1	IIGLRLES LAELGVPFEFHFAVPSK---TSLVTPSMLNCRPGEALLVNFAFQLHHMPDES	431		
PtSCL1	IIGQRLEKLAELAYKVSFEFHAVASK---TSLVNPSMLNCKPGEALLVNFAFQLHHMPDES	429		
AtSCL1	IIGLRLEQLAEDNGVSFKFKAMPSPK---TSIVSPSTLGCKPGETLIVNFAFQLHHMPDES	436		
CsSCR1	ATGKRLSDFAEKLGLPFEFIFIPLADK---PGNLDPERLNVS KREAVAVHWLQHSLYD----	278		
PeSCL	ATGKRLSDFADKLGLPFEFIFVPAEK---VGNLEPERLNVS KREAVAVHWLQHSLYD----	638		
AtSCR	ATGKRLSDFTDKLGLPFEFCPLAEK---VGNLDTERLNVRKREAVAVHWLQHSLYD----	497		
	* * : : : . * : * : . * * : : *			
	PFYRE			
QsSHR	TTVDNRRDY LISNFRRLQPRIITVVEEADLDVGVDG---VEFVKGFQECLRWFRVYLEA	380		
QiSHR1	TAVDNRRDY LISNFRRLQPRIITVVEEADLDVGVDG---VEFVNGFQECLRWFRVYLEA	380		
CsSHR1	TTVDNRRDY LISNFRRLQPRIITVVEEADLDVGVDG---AEFVKGFQECLRWFRVYLEA	379		
AtSHR	ASRGSPRDAVISSFRRLRPRIVTVVEEADLVGEEGGFDDEFLRGFGECLEWRVFCFES	424		
QsSHR2	-EVEE-RGAVIQMFQSLRPRVVTIVEEADLSSSRDD-----FVKCFEECLRFYTYLFEM	323		
QiSHR2	-EVEE-RGAVIQMFQSLRPRVVTIVEEADLSSSRDD-----FVKCFEECLRFYTYLFEM	310		
CsSHR2	-EVEE-RGAVIQMFQSLRPRVVTIVEEADLSSSRDD-----FVKCFEECLRFYTYLFEM	323		
CsSCL3	VSTVNQRDQLLRMVKSLNPKLVTVVEQDVNTNTAP-----FLPRFVEAYNYYSVAFES	477		
CisSCL1	VSTVNQRDQLLRMVKSLNPKLVTVVEQDMNTNTSP-----FFPRFIEAYNYYSVVFES	484		
PtSCL1	VSTVNQRDQLLRMAKSLNPKLVTVVEQDVNTNTAP-----FFPRFTEAYNYYSVAFDS	482		
AtSCL1	VTTVNQRDELLHVMKSLNPKLVTVVEQDVNTNTSP-----FFPRFIEAYEYYSVAFES	489		
CsSCR1	VTGS--DTNMLWLLQRLAPKVVTVVEQDLSHAGS-----FLGRFVEAIIHYYSALFDS	328		
PeSCL	VTGS--DTNMLCCLLQRLAPKVVTVVEQDLSHAGS-----FLGRFVEAIIHYYSALFDS	688		
AtSCR	VTGS--DAHTLWLLQRLAPKVVTVVEQDLSHAGS-----FLGRFVEAIIHYYSALFDS	547		
	: : * * : : : * : : : . * * * . . : : :			

	PFYRE	SAW
QsSHR	LEESFSKTSNE <sup>RLML</sup> ERAA-GRAIVDLVACAPSES----IERR <sup>E</sup> SAAR <sup>WARR</sup> LHVS <sup>GF</sup> SP 435	
QiSHR1	LEESFSKTSNE <sup>RLML</sup> ERGA-GRAIVDLVACAPSES----IERR <sup>E</sup> SAAR <sup>WARR</sup> LHVS <sup>GF</sup> SP 435	
CsSHR1	LEESFSKTSNE <sup>RLML</sup> ERGA-GRAIVDLVACAPSES----IERR <sup>E</sup> SAAR <sup>WARR</sup> LHVS <sup>GF</sup> SP 434	
AtSHR	WEESFPRTSNE <sup>RLML</sup> ERAA-GRAIVDLVACEPSDS----TERR <sup>E</sup> TARK <sup>WSRR</sup> MRNS <sup>GF</sup> GA 479	
QsSHR2	LEESFVPTSNE <sup>RLML</sup> ERDC-SRSIVRVLACDDEKSSEEDCERR <sup>ERGSQW</sup> SERLK-EAFSP 381	
QiSHR2	LEESFVPTSNE <sup>RLML</sup> EREC-SRSIVRVLACDDEKSSEEDCERR <sup>ERGSQW</sup> SERLK-EAFSP 368	
CsSHR2	LEESFVPTSNE <sup>RLLL</sup> ERES-SRSIVRVLACDDEKSSEEDCERR <sup>ERGSQW</sup> SERLK-EAFSP 381	
CsSCL3	LDATLPRESQD <sup>RMN</sup> VERQCLARDIVNIVACEGEE <sup>R</sup> ----IERY <sup>E</sup> VAGK <sup>WRAR</sup> MTMA <sup>GF</sup> TS 533	
CisSCL1	LDATLPRESQD <sup>RMN</sup> VERQCLARDIVNIIACEGEE <sup>R</sup> ----IERY <sup>E</sup> LAGK <sup>WRAR</sup> MTMA <sup>GF</sup> TS 540	
PtSCL1	LDATLPRESQD <sup>RLN</sup> VEKQCLARDIVNIVACEGEE <sup>R</sup> ----IERY <sup>E</sup> VAGK <sup>WRAR</sup> MMMA <sup>GF</sup> TS 538	
AtSCL1	LDMTLPRESQ <sup>E</sup> <sup>RMN</sup> VERQCLARDIVNIVACEGEE <sup>R</sup> ----IERY <sup>E</sup> AAGK <sup>WRAR</sup> MMMA <sup>GF</sup> NP 545	
CsSCR1	LGASYGEESE <sup>E</sup> <sup>EHV</sup> VE <sup>EQ</sup> LLSREIRNVLA <sup>V</sup> GGPS <sup>R</sup> ----SG <sup>E</sup> VKFHN <sup>WREK</sup> LQ <sup>QS</sup> GF <sup>KS</sup> 383	
PeSCL	LGASYGEESE <sup>E</sup> <sup>EHV</sup> VE <sup>EQ</sup> LLSREIRNVLA <sup>V</sup> GGPS <sup>R</sup> ----SG <sup>D</sup> VKFHN <sup>WREK</sup> LQ <sup>QS</sup> GF <sup>KG</sup> 743	
AtSCR	LGASYGEESE <sup>E</sup> <sup>EHV</sup> VE <sup>EQ</sup> LLSKEIRNVLA <sup>V</sup> GGPS <sup>R</sup> ----SG <sup>E</sup> VKFES <sup>WREK</sup> MQ <sup>QC</sup> GF <sup>KG</sup> 602	
	: *::* :*: .: * :*: . . *	
		SAW
QsSHR	ISFSDEVCDVRA <sup>LL</sup> RRYKEG-WSMTQCSDAG----IFLA <sup>W</sup> KDQPVVWAS <sup>AW</sup> RP----- 484	
QiSHR1	ISFSDEVCDVRA <sup>LL</sup> RRYKEG-WSMTQCSDAG----IFLA <sup>W</sup> KDQPVV----- 477	
CsSHR1	ISFSDEVCDVRA <sup>LL</sup> RRYKEG-WSMTQCSDAG----IFLA <sup>W</sup> KDQPVVWAS <sup>AW</sup> RP----- 483	
AtSHR	VGYSDEVADDVRA <sup>LL</sup> RRYKEGVWSMVQCPDAG---IFLC <sup>W</sup> RDQPVVWAS <sup>AW</sup> RPT----- 531	
QsSHR2	VGFSDDVDDVKA <sup>LL</sup> KRYKAG-WALVLPQGDHDDSGIYLT <sup>W</sup> KEEPVLWAS <sup>AW</sup> KP----- 434	
QiSHR2	VGFSDDVDDVKA <sup>LL</sup> KRYKAG-WALVVPQGDHDDSGIYLSCKE----- 410	
CsSHR2	VGFSDDVDDVKA <sup>LL</sup> KRYSAL-IPLLAL----- 408	
CsSCL3	CPMGPKVIDTIQN <sup>L</sup> IR-EYCDRYKLKKEMGALH----FG <sup>W</sup> EENLIVAS <sup>AW</sup> R----- 580	
CisSCL1	CPMSADVTD <sup>MIR</sup> K <sup>L</sup> IK-QYCDRYKLKEELGLLH----FG <sup>W</sup> EDKSLIVAS <sup>AW</sup> K----- 587	
PtSCL1	CSITPNVDMIRK <sup>L</sup> IK-EYCDRYMLKQEVGALH----FG <sup>W</sup> EDKSLIVAS <sup>AW</sup> K----- 585	
AtSCL1	KPMSAKVTNNIQN <sup>L</sup> IKQYCNKYKLKEEMGELH----FC <sup>W</sup> EENLIVAS <sup>AW</sup> R----- 593	
CsSCR1	LSLAGNAATQATL <sup>LL</sup> GMFSPDGYTLVEDNGTLK----LG <sup>W</sup> KDLCLLTAS <sup>AW</sup> RP----- 432	
PeSCL	ISLAGNAATQATL <sup>LL</sup> GMFSPDGYTLVEDNGTLK----LG <sup>W</sup> KDLCLLTAS <sup>AW</sup> RPFHDTIE 798	
AtSCR	ISLAGNAATQATL <sup>LL</sup> GMFSPDGYTLVDDNGTLK----LG <sup>W</sup> KDLSLLTAS <sup>AW</sup> TPRS---- 653	
	.. *: :	
QsSHR	-----	
QiSHR1	-----	
CsSHR1	-----	
AtSHR	-----	
QsSHR2	-----	
QiSHR2	-----	
CsSHR2	-----	
CsSCL3	-----	
CisSCL1	-----	
PtSCL1	-----	
AtSCL1	-----	
CsSCR1	-----	
PeSCL	TATTIPHHHHHHQQQHHHHHHHHRFVTA 826	
AtSCR	-----	

**Figura 27:** Alineamiento, mediante clustalW2, de las secuencias aminoacídicas predichas de CsSCL3, CsSHR1, CsSHR2 y CsSCR1 con otros miembros de la familia GRAS. Sobre las secuencias se localizan los motivos característicos del dominio GRAS y en color resaltamos los aminoácidos conservados en cada dominio. En amarillo se muestran los motivos característicos de la región amino terminal y en rosa el NLS de AtSCR. Las secuencias utilizadas fueron: AtSCL1 (NP\_173566.1), AtSCR (NP\_190990.1), AtSHR (NP\_195480.1), CsiSCL1 (XP\_006472900.1), PeSCL (XP\_011015033.1), PtSCL1 (XP\_002302201.1), QiSHR1 (AIO08306.1), QiSHR2 (AIO08307.1), QsSHR (AET37154.2) y QsSHR2 (AIO08308.1).



**Figura 28:** Árbol filogenético de la familia GRAS en diferentes especies. Las dos primeras letras de cada secuencia indican la especie, At: *Arabidopsis thaliana*; Cs: *Castanea sativa*; La: *Lupinus albus*; Li: *Lilium longiflorum*; Md: *Malus domestica*; Pr: *Pinus radiata*; Ps: *Pisum sativum*; Pt: *Populus trichocarpa*; Qs: *Quercus suber*; Qi: *Quercus ilex*; Rc: *Ricinus communis*; Vv: *Vitis vinifera*. La construcción del árbol se llevó a cabo con el programa MEGA6, por el método Neighbor-Joining (1000 réplicas con bootstrap) y empleando como “outgroup” la proteína HsSCR. Los números de acceso del GenBank se incluyen en la Tabla 9.

## 3.2. OTROS GENES CARACTERIZADOS

### 3.2.1. *Castanea sativa* Gretchen hagen 3.2 (CsGH3.2)

Se obtuvo una secuencia de 2255 pares de bases, que denominamos *CsGH3.2* (*Castanea sativa* Gretchen Hagen 3.2). Dicha secuencia codifica una proteína completa de 599 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 67,62 KDa y un punto isoelectrico de 6,03. La secuencia nucleotídica incluye un fragmento de la región 5'UTR (168 pb) y la región 3'UTR que contiene la cola de poli-A (287 pb). En la Figura 29 se muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, así como los codones de iniciación y terminación y la localización de los cebadores utilizados en el aislamiento de la secuencia y en los análisis de expresión. En la secuencia deducida de aminoácidos, se localizaron los tres motivos característicos de la familia GH3 (SSGTSAGERK, YASSE, YRVGD) y además se han identificado ocho posibles sitios de N-miristoilación, cinco de fosforilación de la proteína quinasa C (dos de fosfoserina y tres de fosfotreonina), once de fosforilación de la caseína quinasa II (seis fosfoserina y cinco fosfotreonina), tres de N-glicosilación y uno de fosforilación de la tirosina quinasa.

```

1  acacccagccccaggcagctctttacattagacttttagagtcctcactccaatccaacaca
61  gacaaaaaaaaagaagaaaaacccatcatcttcatctcaaacacaaacacagttttttctaa
    tttcttctttt att
121 aaactttctcatattttaattttctaaagtcacaaaacccaaacccaaatgggctgttggt
    tt tggttttggttt M A V G 4
181 tctgctatttcatccccctcttgccctgcgtcttctgtgacaaagacgccaaggctctccaa
    S A I S S P L G P A S C D K D A K A L Q 24
241 ttcgttgaagagaccactagaaacgccgatttggttcaagagagagctcttggtgaaatc
    F V E E T T R N A D L V Q E R V L A E I 44
301 ttggccagaaatgccaacactgagtacctcaaaagggttcaacctcaacggtgccacagac
    L A R N A N T E Y L K R F N L N G A T D 64
361 cgtgactctttcaaatccaagctacccatgattacctacgaggatcttcagcctgaaatc
    R D S F K S K L P M I T Y E D L Q P E I 84
421 caacgtatttgtaattggagaccgctctcttattctctctgctcaccccatctctgagttc
    Q R I A N G D R S P I L S A H P I S E F 104
481 ctcaccagttctgggacttcagctggggaagaaaactcatgccaacaattcaggaagag
    L T S S G T S A G E R K L M P T I Q E E 124
541 ttggatcgctgccagctactgtacagccttctcatgccagtgatgaacctttatgtgccg
    L D R R Q L L Y S L L M P V M N L Y V P 144
601 ggtttgacaaaggaaaaggcttgacttcttggttgtaagtccgaaaccaagactccg
    G L D K G K G L Y F L F V K S E T K T P 164
661 ggtgggctattggcccgaaccgttctgaccagctactacaagagtgagcacttcaagacc
    G G L L A R P V L T S Y Y K S E H F K T 184
721 cgaccctatgaccgtacaatgtctacacaagcccaatgaggcaatcctatgcccgat
    R P Y D P Y N V Y T S P N E A I L C P D 204
781 tcattccaaagcatgtacacccaaatgctatgtggccttatccaacgcaaccaagtcctc
    S F Q S M Y T Q M L C G L I Q R N Q V L 224
841 cgctcggcgccgtcttcgcctcgggtctcctccgtgccatccgctttctccaactcaat
    R L G A V F A S G L L R A I R F L Q L N 244
901 tggacccaactcgtccacgacctcaaaactgggacctcaacccgagaattaccgacctg
    W T Q L V H D L K T G T L N P R I T D P 264
961 gttctaaaagaacacatgaccgctatcctgaaacccgaccagaaatgtccaattttatt
    V L K E T M T R I L K P D P E M S N F I 284
1021 agcaaggagtgtctaaaggaagattgggagggaattttaactagaatttggcccaacaca
    S K E C S K E D W E G I L T R I W P N T 304

```

1081	aagtacttggatgtgattgttactggatctatggcacagtatattccaacgttggattac	
	K Y L D V I V T G S M A Q Y I P T L D Y	324
1141	tacagtgggtggattgccactcgcttgactatgtacgcgtcctcgagtggttactttggt	
	Y S G G L P L A C T M Y A S S E C Y F G	344
1201	ctaaacctaaaccccatgtgtaagccttcggaagtgtcttataaccataatgccaaacatg	
	L N L N P M C K P S E V S Y T I M P N M	364
1261	gcctacttcgagtttctgcctcacgatacctaactcgccgggtgcacaactcgtgactca	
	A Y F E F L P H D P N S A G C T T R D S	384
1321	cctccaaaacttgttgaccttgttgatgtagaagttgggaaagagtatgagcttgtgatc	
	P P K L V D L V D V E V G K E Y E L V I	404
1381	actacctacgcaggactttgcaggtaccgagttggtgacatcctccgagtcaccgggttc	
	T T Y A G L C R Y R V G D I L R V T G F	424
1441	cacaactcggccccacagttccacttcgtgaggaggaagaacgtgttggtgagtattgac	
	H N S A P Q F H F V R R K N V L L S I D	444
1501	tcagacaagactgacgaagccgagttacagaaagccgtggagaacgcgttgacagctgttg	
	S D K T D E A E L Q K A V E N A L Q L L	464
1561	aaagagttcaacaccagtgctcgttgagtacacgagttacgctgatacgaagacgattcct	
	K E F N T S V V E Y T S Y A D T K T I P	484
1621	ggtcactacgtgatataattgggagcttttggttaaagactcggctaactcgccaagtgag	
	G H Y V I Y W E L L V K D S A N S P S E	504
1681	gaagtactaagtcggtgctgtttggcgatggaggaatcgcttaactcagtgtagacaaa	
	E V L S R C C L A M E E S L N S V Y R Q	524
1741	ggccgagttgctgacaactcaattggaccgcttgagatacgtgtggtcaaaaacggtacg	
	G R V A D N S I G P L E I R V V K N G T	544
1801	tttgaggagttaattgattatgcaatttcaagaggggccttatcaaccagtagaggtg	
	F E E L M D Y A I S R G A S I N Q Y K V	564
1861	ccgaggtgtgtgaattttacaccataatggagcttttggattctagggttatctcaaca	
	P R C V N F T P I M E L L D S R V I S T	584
1921	catttttagtccggccttgccacgttggactcccgaaagaaaacgcataaaccgaccaat	
	H F S P A L P R W T P E R K R	599
1981	tcgactcaaccaaccaaccaacccaataacaagtcaatgagatgctcataaaagtagattct	
2041	acttgtgttattttcttatagttaattatttagttctttcttttcttttcttttttgggtc	
2101	tgttgcataatgaataggggttctgggtgggaaagtggaaaggaaaagtgaatgtggggat	
2161	taggatgtttcaggggtcagttttgtattatggttcaattaacttaagggaaggatgt	
2221	tacatttgtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	2255

**Figura 29:** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del ADNc *CsGH3.2*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja y los utilizados en los análisis de qPCR están subrayados. En rojo se indican los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAA). En la región promotora se muestran los motivos 5'UTR Py-rich stretch (violeta), ARE (granate), LAMP-element (rosa) y las cajas CAAT y TATA (azul). Se representa en mayúsculas la secuencia de aminoácidos y en verde los tres motivos conservados.

En el extremo 5'UTR, también se identificaron secuencias características de la región promotora de otros genes. Se localizaron los siguiente motivos: el “5'UTR Py-rich stretch” que confiere altos niveles de transcripción (secuencia 5'-TTTCTTCTCT-3' de la hebra complementaria), dos motivos ARE consecutivos (con la secuencia 5'-TGGTTT-3' ubicados en la hebra complementaria) que actúa como elemento regulador esencial en la inducción anaeróbica, el motivo “LAMP-element” (5'-CCAAAACCA-3') que forma parte de un elemento de respuesta a la luz y una caja CAAT y dos cajas TATA (una en cada hebra) que son regiones de unión a factores de transcripción.

El análisis mediante BASTP de la secuencia codificante mostró que posee alta homología con la proteína GH3.1 de *Vitis vinífera* que ha sido caracterizada estructuralmente, lo que nos



permitirá identificar el centro catalítico de unión a auxinas. CsGH3.2 también presentó alta homología con las secuencias proteicas deducidas de los genes *CsGH3.1* y *QsGH3.1*, que fueron caracterizados en nuestro laboratorio en roble y en castaño, así como con la proteína GH3.1 de *Arabidopsis thaliana* (Tablas 29). En la Figura 30 se presenta el alineamiento realizado con las 4 secuencias mencionadas anteriormente, donde se muestran los tres motivos conservados (I, II y III) de unión del ATP/AMP, característicos de la familia génica. De acuerdo al análisis realizado en la proteína GH3.1 de *Vitis*, también se evidencia la presencia de determinados residuos conservados con papel relevante en actividad enzimática, y que describimos a continuación en base al análisis de VvGH3.1 La arginina en posición 115 participa en la preferencia de la proteína por conjugar aspartato. Los residuos Ser-108, Tyr-336, Asp-417 y Phe-433, estrictamente conservados, y Thr-312 y Met-335, altamente conservados, participan en la unión a ATP (verde). El anillo de adenina queda unido mediante un puente de hidrogeno al Thr-312, ocupando un hueco hidrofóbico creado por los residuos Tyr-336, Phe-433 y Ile-310. Para la correcta orientación del ATP para la catálisis, es fundamental la unión de Mg<sup>2+</sup> al Glu-340. El anillo indol de la auxina ocupa el hueco que conforman Arg-115, Lys-158, Ser108, Pro-171, Leu -173 y Ser-445. En la unión a AIA participan otros cuatro residuos altamente conservados (Val-172, Leu-173, Ala-337 y Tyr-342) y forman enlaces de puente de hidrogeno con Ser-107, Ser-108, Ser-339 y Tyr-342 (naranja).

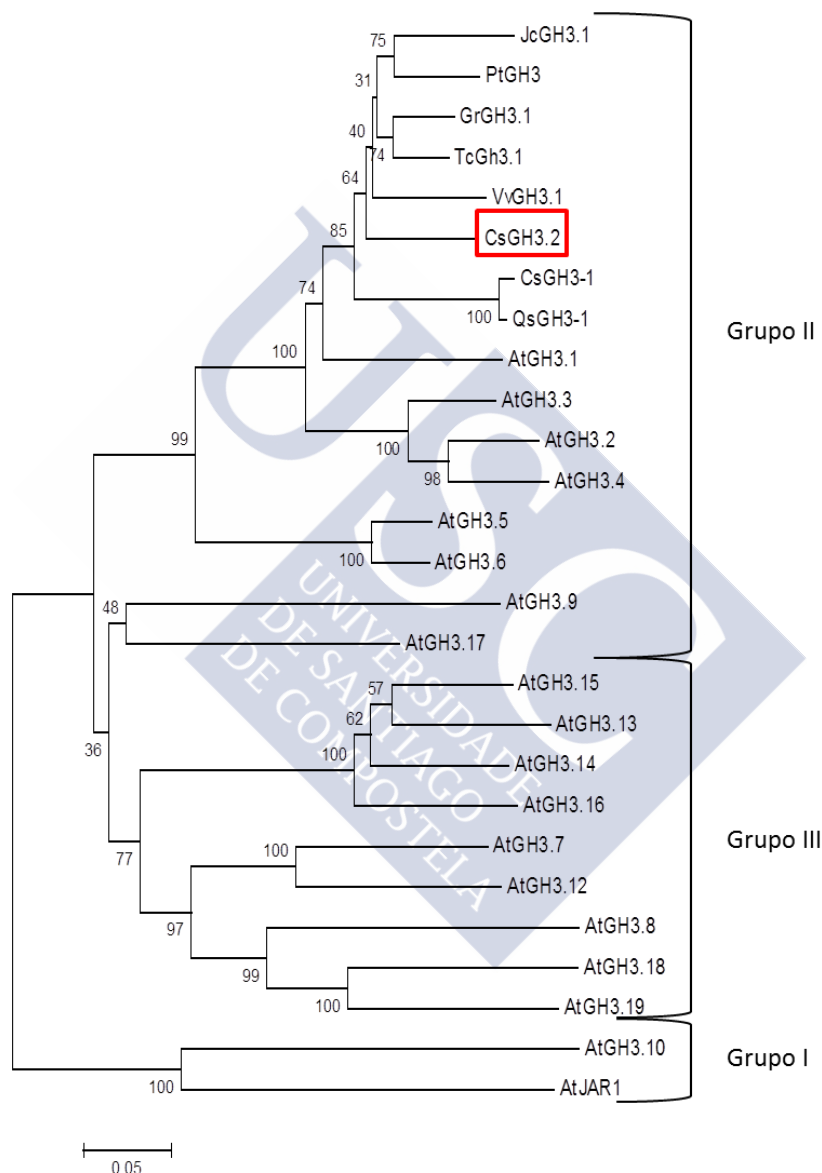
**Tabla 29:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CsGH3.2*. El valor “Ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar.

Proteína	Ident	E-Valor
>gi 823160666 ref XP_012480180.1  PREDICTED: probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1 [ <i>Gossypium raimondii</i> ]	89%	0,0
>gi 590687104 ref XP_007042570.1  Auxin-responsive GH3 family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	89%	0,0
>gi 802550602 ref XP_012093069.1  PREDICTED: probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1 [ <i>Jatropha curcas</i> ]	87%	0,0
>gi 225429317 ref XP_002271252.1  PREDICTED: probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	86%	0,0
>gi 566151864 ref XP_002300248.2  auxin-responsive GH3 family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	86%	0,0
>gi 378747661 gb AFC36444.1  GH3-1 [ <i>Quercus robur</i> ]	82%	0,0
>gi 15226032 ref NP_179101.1  putative indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	81%	0,0
>gi 378747659 gb AFC36443.1  GH3-1 [ <i>Castanea sativa</i> ]	82%	0,0

[illegible]

CsGH3.2	PERKR-	599
VvGH3.1	PARRR-	598
AtGH3.1	PERRRR	590
CsGH3-1	PQRSC-	603
QrGH3-1	PRRSC-	603
	* *	

**Figura 30:** Alineamiento mediante clustalW2, de la secuencia aminoacídica deducida de *CsGH3.2* con otros miembros de la familia GH3, incluyendo la secuencia *AtGH3.1* por ser con la que presenta más homología. Sobre las secuencias se localizan los motivos característicos del dominio GH3. Los aminoácidos conservados esenciales para la actividad enzimática se indican en color verde, los implicados en la unión del ATP/ADP; naranja los implicados en la unión de AIA; y rojo el residuo implicado en la selectividad del aminoácido conjugado. Los números de acceso de las secuencias utilizadas son: *AtGH3.1* (NP\_179101.1), *CsGH3.1* (AFC36444.1), *QrGH3.1* (AFC36443.1) y *VvGH3.1* (XP\_002271252.1)



**Figura 31:** Árbol filogenético de la familia de proteínas GH3 de diferentes especies. Las dos primeras letras de cada secuencia corresponden a la especie, At: *Arabidopsis thaliana*; Cs: *Castanea sativa*, Gr: *Gossypium raimondii*, Jc: *Jatropha curcas*, Pt: *Populus trichocarpa*, Qr: *Quercus robur*, Tc: *Theobroma cacao*, Vv: *Vitis vinifera*. La construcción del árbol se llevó a cabo con el programa MEGA6, por el método Neighbor-Joining (1000 réplicas con bootstrap). Los números de acceso del GenBank se incluyen en la Tabla 10 (Material y Métodos).

Para finalizar, hemos realizado un árbol filogenético incluyendo las proteínas de la familia GH3 caracterizadas en *Arabidopsis thaliana* (de la 1 a la 19) y las proteínas con mayor grado de homología con la secuencia del CsGH3.2, entre las que se incluyen la GH3-1 de castaño y roble. Como podemos observar en la Figura 31, las secuencias incluidas permiten diferenciar los tres grupos de la familia, confirmando que la secuencia caracterizada en castaño, CsGH3.2 pertenece al grupo II de enzimas implicadas en la homeostasis de auxinas.

### 3.2.2. *Castanea sativa* UDP-Glicosiltransferasa (CsUGT)

Utilizando la misma metodología, también se identificó una secuencia de 1672 pares de bases, que denominamos *CsUGT* (*Castanea sativa* UDP-Glicosiltransferasa), que codifica para una proteína predicha de 458 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 51,42 KDa y un punto isoelectrico de 5,55. Además contiene un pequeño fragmento de 46 nucleótidos de la región 5'UTR y la región completa 3'UTR de 247 pb que incluye la cola de poli-A. En la Figura 32 se muestra la secuencia de nucleótidos, la secuencia deducida de aminoácidos, los codones de iniciación y de terminación, así como los cebadores utilizados en las reacciones de RACE y PCR y los empleados en los estudios de expresión mediante qPCR. En la secuencia de aminoácidos, también se localizó el motivo PSPG, ("plant secondary product glycosyltransferase box") característico de la familia UDP-Glicosiltransferasa. Además se identificaron los motivos 2 y 3, semiconservados y se localizaron cuatro puntos de N-miristoilación, dos de fosforilación de la proteína quinasa C de fosfoerina, ocho de fosforilación de la caseína quinasa II (tres fosfoerina y cinco fosfotreonina), y uno de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc o GMPc. En la región 5'UTR, región promotora, se localizó una secuencia tipo AuxRE (GAGACA), y el motivo AAGAA, identificado en avena, del cual no se ha descrito su función.

```

1  acgcggggagacatgattagaaagaaaaaagaatcaaaagcaaaaatgagcaattcaaga
                                     M S N S R      5
61  tgcacaaaacttcattgtagccatgtttccctgggttgcctttggccatatcactccctac
    C T K L H V A M F P W F A F G H I T P Y      25
121 ctgcacctctcaacaagcttgagagagaggccatagggtgtctttcttactgccccaa
    L H L S N K L A E R G H R V S F L L P K      45
181 ggagcacaagcaaaggtagaacatctcaacctctatccaaacctcatccacttctatccc
    G A Q A K V E H L N L Y P N L I H F Y P      65
241 cttcttgttcccactgtagatagactacccctgggtgccgagactacctcagatattcct
    L L V P T V D R L P P G A E T T S D I P      85
301 cctccacttcttgggtcatcttcttattgcctttgaccaaaccgaagaccaagttcaaacc
    P P L L G H L L I A F D Q T Q D Q V Q T      105
361 attctgaccagtctcaagcctgatttcattttctttgacttcagcctttggatgccagcc
    I L T S L K P D F I F F D F S L W M P A      125
421 ctagctcaccaaattgggtccaaggccatattgttacaccattgtaaccccagcagcgcca
    L A H Q I G S K A I C Y T I V T P A A P      145

```

481	gcacttacggttcctaccaaggacaaaccagaggacatgactgtacaagacttcatgcaa	
	A L T V P T K D K P E D M T V Q D F M Q	165
541	ctgccacctggctatcctccttcgtgctgcaatgaagtccaaggactatgagattgca	
	L P P G Y P P S C V R M K S K D Y E I A	185
601	caactaaaagtagttgccaagcctcatggaacagagatgtctcttttatgttcgaattacc	
	Q L K V V A K P H G T E M S L Y V R I T	205
661	tatggcttgattcggagtgatgccgtggcgcttaggacatatcatgagtttgaagggcca	
	Y G L I R S D A V A L R T Y H E F E G P	225
721	tactgtgactacttaaggcagcattatgctaaacctgtgctgctaacaggacctgtcttg	
	Y C D Y L R Q H Y A K P V L L T G P V L	245
781	cctgaaactccggccacaaagctagacgagaaatggactaattggttatgcaatttcaag	
	P E T P A T K L D E K W T N W L C N F K	265
841	caagggtactgtggtgtattgtgcatttgggagtgcaaaataaactgcaaaaggaccagttt	
	Q G T V V Y C A F G S Q N K L Q K D Q F	285
901	caggagctacttttggggtttgagttatgtgggcaaccatttttgggtggctctgagtagt	
	Q E L L L G F E L C G Q P F L V A L S S	305
961	ccagatggttgcgcaacagttgaagaagcttttcagatgggtttgaagagagagttaaa	
	P D G C A T V E E A F P D G F E E R V K	325
1021	gggagaggatgggtgtatgggggatgggtgccacaaacattgatattggagcaccatct	
	G R G W V Y G G W V P Q T L I L E H P S	345
1081	attggctgttctgtgacacattgtggatgtgggtctatgtgggagtcctctcttgagtgat	
	I G C S V T H C G Y G S M W E S L L S D	365
1141	tgccaaatagtatgcgttcattccttgggtgatcaaactgtgggtgccagggttaattggtg	
	C Q I V C V P F L G D Q T V G A R L M V	385
1201	gaacaactcaaagttgcggtggaggtggagagagataatgggtgggatttccaaggaa	
	E Q L K V A V E V E R E D N G W I S K E	405
1261	agcataagtaaggccattatctctgtgatggacgaggacagtgaatatctgggctggtg	
	S I S K A I I S V M D E D S E I S G L V	425
1321	aaatataatcatgccaaagttgaaggaggaacttactagtgaaggcatgcaagagagatat	
	K Y N H A K L K E E L T S E G M Q E R Y	445
1381	ttagacactttcattcaaaacctgcaaggtccttatggatTgaactaagtgtacatatgaa	
	L D T F I Q N L Q G L M D	458
1441	cccgattacgtaatcctttgcactaaaaaagagcagtagcagtttcaattgaggaaggatt	
1501	cactcgtgttatagtttggggatgctacttctttgtcaatggtgttctatttggatatcc	
1561	gttgattttcttttctgggtgtccttgtgttttgttctcttttagcaaaaaaataaca	
1621	atgctaaggaaa	1672

**Figura 32:** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del ADNc *CsUGT*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja y los utilizados en los análisis de qPCR están subrayados. En rojo se indican los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TGA). En la región promotora se localizan los motivos AuxRE (amarillo) y AAGAA (subrayado). Se representa en mayúsculas la secuencia aminoácidos y en verde el motivos conservado PSPG y los motivos semiconservados 2 y 3.

El análisis mediante BLASTP (Tabla 30) mostró que las proteínas con las que presenta mayor grado de homología han sido descritas como glicosiltransferasas (GTs) de la familia 1 (UGTs), las cuales catalizan la incorporación de azúcares a diversas moléculas aceptoras mediante la formación de enlaces glicosídicos. Dentro de esta familia, podría ser una antocianidina 3-O-glucósido 2-O-xilosiltransferasa, perteneciente al grupo antiguamente caracterizado como UGT79B. Aun así, el porcentaje de identidad es más bajo que en otras ocasiones. En el alineamiento (Fig. 33) se han incluido tres proteínas, de las cuales se conoce su estructura cristalográfica y tridimensional para identificar el centro catalítico y los dominios de unión a las moléculas donadoras y aceptoras de azúcares. Esta familia de proteínas es muy amplia y diversificada lo que hace que incluso el motivo característico PSPG no esté tan conservado como ocurre en otras familias (Fig. 34). Como se muestra en el

alineamiento la secuencia HCGW, estrictamente conservada en otras especies, en la secuencia de castaño difiere en el último residuo. En la Figura 33 se muestran en rojo algunos residuos altamente conservados en las UGTs de plantas (Wang, 2009). Los aminoácidos marcados en naranja interactúan con la molécula aceptora para la formación de antocianinas en *Vitis* y en *Medicago*, sin embargo, la mayoría de ellos no están conservados en CsUGT.

Para la construcción del árbol filogenético, se han utilizado una gran variedad de proteínas de esta familia, incluyendo algunas ya caracterizadas en diversas especies como *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sesamum indicum* y *Linum usitatissimum*. Algunas de estas proteínas están caracterizadas por presentar un patrón de expresión específico de la raíz (identificadas con Root) o por el sustrato sobre el que actúan, como es el caso de numerosas antocianidin 3-O-glucósido 2-O-xilosiltransferasas (identificadas como Ant). En base a su homología, cabría esperar que la proteína predicha CsUGT estuviese dentro de la clasificación de estas GTs. En el árbol, también se han incluido otras proteínas implicadas en la regulación hormonal de auxinas y citoquininas (identificadas como AIA, Cit, Cis-ZO y Cis-ZN). Como se observa en la Figura 35, la proteína CsUGT aparece en el grupo A con otras antocianidin 3-O-glucósido 2-O-xilosiltransferasas, aunque este tipo de proteínas no son exclusivas del grupo A, ya que también pueden encontrarse en otros grupos de la familia. La inclusión en el árbol filogenético de otras proteínas asociadas con raíz tampoco nos ha permitido establecer ninguna correlación entre la filogenia y la especificidad de tejido.

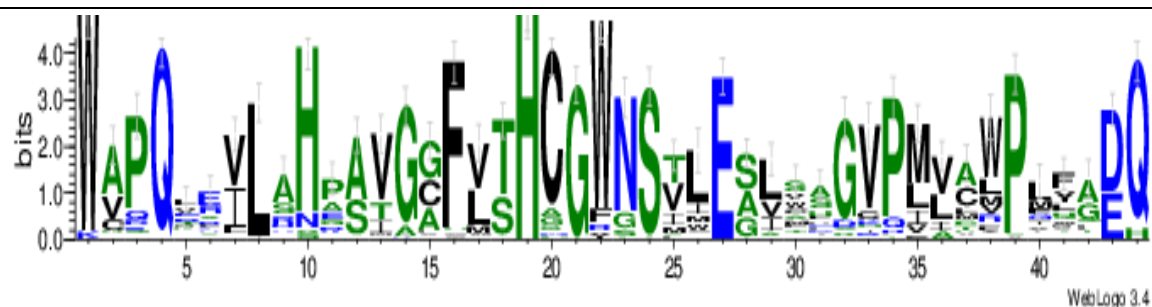
**Tabla 30:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CsUGT*. El valor “Ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología encontrada sea debida al azar.

Proteína	Ident	E-Valor
>gi 590609742 ref XP_007021621.1  UDP-Glycosyltransferase superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	60%	0.0
>gi 802796888 ref XP_012092880.1  PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 79B6-like [ <i>Jatropha curcas</i> ]	59%	0.0
>gi 731432091 ref XP_002282825.3  PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 79B6-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]	54%	5e-175
>gi 387135188 gb AFJ52975.1  UDP-glycosyltransferase 1 [ <i>Linum usitatissimum</i> ]	54%	2e-170
>gi 224114583 ref XP_002316802.1  glycosyltransferase family protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	51%	4e-164
>gi 15239525 ref NP_200212.1  UDP-glycosyltransferase 79B6 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	50%	1e-158

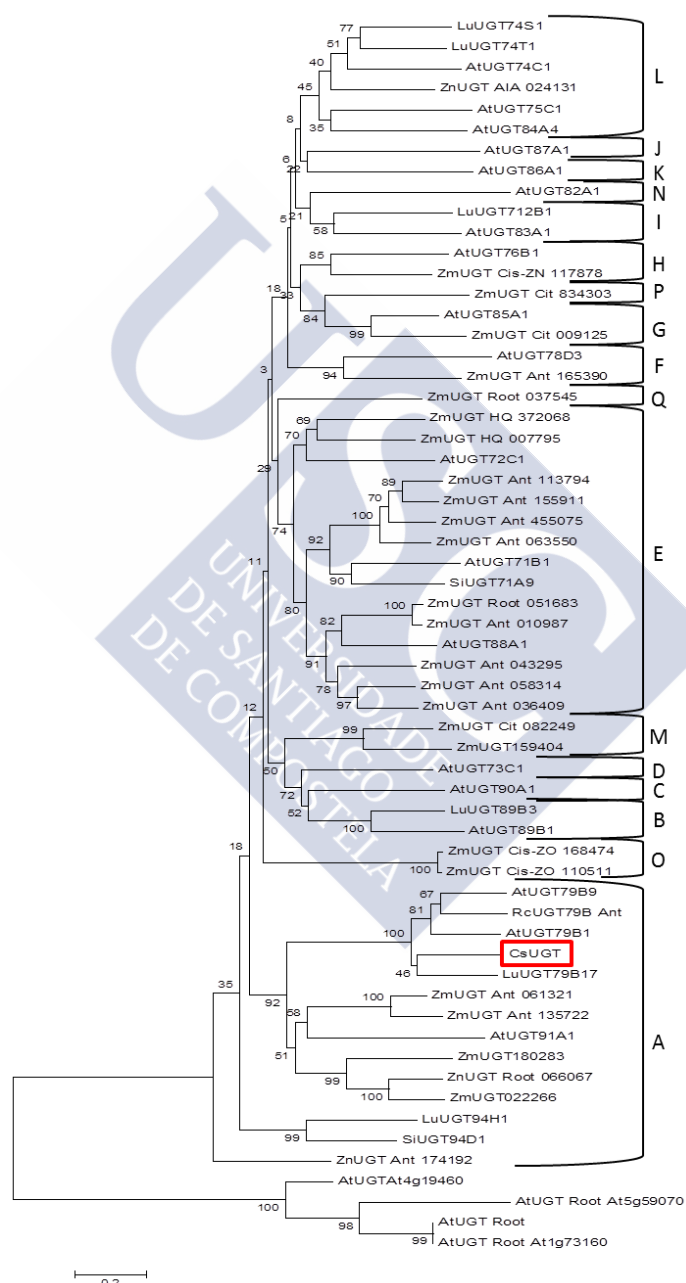


CsGLY	-MSNSRCKTLHVAMFPWFAGF	HITPYLHLSNKLAERGHRSFLLPKGAQAKVEHLNLYPN	59				
MtUGT85H2	-MGNFANRKPHVVMIPYPVQGH	INPLFKLAKLLHLRGFHITFV--NTEYNHKRLLKSRGP	57				
MtUGT71G1	MSMSDINKNSELIFIPAPGIGH	LASALEFAKLLTNHDKNLYITVFCIKFPGMPFADSYIK	60				
VvUGT	--MSQTTTNPHVAVLA	FPFSTHAAPLLAVVRRLAAAAPHAVFSFFSTSQ---SNASIFHD					
	.	: .: .:	* . . *				
CsGLY	LIHF-YP--LLVPTVDRLPPGAETTS	DIPP-----PLLGHLLIAFDQTQDQVQT	105				
MtUGT85H2	KAFDGF	TDFNFESIPDGLTPME-GDGDVSQDVPTLCQSVRKNFLKPYCELLTRLN---HS	113				
MtUGT71G1	SVLASQPQIQ	LIDLPEVEPPPQELLKSPEFYILTF-----LESLIPHVKATI---KT	109				
VvUGT	SMHTMQCN	IKSYDISDGVPEGYVFAGRPQEDIELFTRAAPESFRQGMVMAVAE-----					
	:	:	:				
Motivo 3							
CsGLY	ILTSCLKPDFIFF	DFSLWM-PALAHQIGSKAICYTIVTPAAPALTVP	TKD-----KP 155				
MtUGT85H2	-TNVPPVTCLVS	DCCMSFTIQAAEEFELPNVLYFSSSACSLNVMHFRS	FVERGIIPFKD 172				
MtUGT71G1	-ILSNKVVL	LVDFFFCVSMIDVGNFEGIPSYLFLTSNVGFLSLMLSLKN-RQ-----IE	161				
VvUGT	--TGRPVSVCLVAD	AFIWFAADMAAEMGLAWLPFWTAGPNSLSTHVYIDEIRE-----KI					
	: . *	. : :	:				
CsGLY	EDMTVQ---	DFMQLPPGYPPSCVRMKS	KDYEIAQLKVVAKPHGTEMSLYVRITYGLIRS 211				
MtUGT85H2	ESYLTNGC	LETKVDWIPLGN---FRL--KDIVDFIR	TNPNDIMLEFFIEVADRNVKD 226				
MtUGT71G1	EVFDDSDRD	-HQLLNIPGISN---QVP--SNVLPD	ACFNKDGGYIA--YYKLAERFRDT 213				
VvUGT	GVSGIQGRE	DELLNFIPGMSK---VRF--RDLQEGIVFGNLSL	FSRMLHRMGQVLPKA				
	.	:	**				
	:	:	:				
	:	:	:				
CsGLY	DAVALR	TYHEFEGPYCDYLRQHY--AKPVLLTGPVLPETPA-----TKLDE	255				
MtUGT85H2	TTILLNTF	NELESDVINAL---SSTIPSIYPIGPLPSLLKQTPQIHQLDSLDSNLWKEDT	283				
MtUGT71G1	KGII	VNTFSDLEQSSIDALYDHDEKIPPIYAVGPLDLKGQPNPK-----LDQAQHD	265				
VvUGT	TAVFINS	FEELEDDSLTNDL---KSKLKY	LYNIGPFNLITPPP-----VVPNTT				
	: : .: .: :	: *	**.				
Motivo 2							
CsGLY	KWTNWL	CNFKQGT	VVYCAF	GSQNK-L-QKDQFQELLGFE	LCGQPF	VALSSPDGCATVEE	314
MtUGT85H2	ECLDWLES	KEPGSVVYVNF	GSITVM-TPEQLLEFAWGLANCKKS	SFLWII	IRPD-LVIGGSV	341	
MtUGT71G1	LILKWL	DEQPDKSVVFLCF	SGSMGV	SFGPSQIREIALGLKHSGVRFLWSNSAE-K-----K	319		
VvUGT	GCLQWL	KERKPTS	SVVYIS	FGT	VTTTP-PPAEVV	ALSEALEASRVFFIWSLRDK-AR----V	
	. ** .	: **: *	:	: . :	: . :	*:	
PSPG							
CsGLY	AFPDGFEER--	VKGRGWVYG	WVQ	TLILEHPSIGCSVT	HCGYGS	SMWESLLSDCQIVCV	372
MtUGT85H2	IFSSEFTNE--	IADRGLI-AS	WCPQDKVLN	HPSIGGFLTHCGWNS	TTESICAGVPMLCWP	398	
MtUGT71G1	VFPEGFLEW	MELEGKMI-CG	WAPQVEVLA	HKAIGGFVSHCGWNS	ILES	SMWFGVPILTWP	378
VvUGT	HLPEGFLEK--	TRGYGMV-VP	WAPQAEVLA	HEAVGAFVTHCGWNS	SLWESVAGGVPLICRP		
	: . *	:	*	:	* **	: * * : *	: : *
	:	:	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:	:	:
CsGLY	FLGDQ	TVGARLMVEQLKVAVEVERE---	DNGWISKESISKAIISVMDEDSEISGLVKYNH	429			
MtUGT85H2	F	FADQPTDCRFICNEWEIGMEIDTNVKR-----	EELAKLINEVIAGDKGKK--MKQKA	449			
MtUGT71G1	I	YAEQQLNAFRLVKEWVG	LGLRVDYRKGS	DVVAAEEIEKGLKDLMD--KDSI--VHKKV	434		
VvUGT	F	FGDQRLNGRMVEDVLEIGVRIEGGVFTKSG	LMS-----CFDQILSQEKGKK--LREN				
	: . : *	:	.	: .: :	:	: .: :	: : :
CsGLY	AKLK---	EELTSEGMQERYLDTFIQNLQGLMD-					
MtUGT85H2	MELKKK	AEENTRPGGCSYMNLNKVIKDVLLKQN-					
MtUGT71G1	QEMKEM	SRNAVVDGGSS	LISVGKLIDDITG----				
VvUGT	RALRET	ADRAVGPKGSSTENFITLVDLVSKPKDV					
	:	:	.	*	.	. . . . :	:

**Figura 33:** Alineamiento mediante clustalW2, de las secuencias aminoacídicas de la proteína CsUGT con otros miembros de la familia UGT: MtUGT71G1 (2ACV), MtUGT85H2 (ABI94024.1) y VvUGT (P51094.2). Sobre la secuencia se localizan en rojo los motivos PSPG, 2 y 3, en naranja los residuos implicados en la actividad catalítica y en la unión a moléculas donadoras y aceptoras de azúcares y en rojo los residuos altamente conservados en esta familia de proteínas.



**Figura 34:** Representación gráfica de la variabilidad del motivo PSPG de las proteínas incluidas en el árbol filogenético de la Figura 35. Los números de acceso del GenBank se incluyen en la Tabla 11 (Material y Métodos).



**Figura 35:** Árbol filogenético de la familia de proteínas UDP-Glicosiltransferasa de diferentes especies. Las dos primeras letras de cada secuencia corresponden a la especie, At: *Arabidopsis thaliana*; Cs: *Castanea sativa*; La: *Lupinus albus*; Rc: *Ricinus communis*; Si: *Sesamum indicum* y Zn: *Zea mays*. La construcción del árbol se llevó a cabo con el programa MEGA6, por el método Neighbor-Joining (1000 réplicas con bootstrap). Los números de acceso del GenBank se incluyen en la Tabla 11 (material y métodos).

### 3.2.3. *Castanea sativa* early nodulin 93 (*CsENOD93*)

Finalmente, se caracterizó una secuencia de 636 pares de bases que codifica para una proteína putativa de 107 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 11,13 KDa y un punto isoelectrico de 10,28, a la que denominamos *CsENOD93* (*Castanea sativa* early nodulin 93). La secuencia nucleotídica incluye parte del extremo 5'UTR de 102 pb y el extremo 3'UTR de 210 pb que contiene la cola de poli-A. En la Figura 36 se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos, los codones de iniciación y de terminación, la localización de los cebadores utilizados en las reacciones de RACE, y de los empleados para los análisis mediante qPCR. La secuencia aminoacídica presenta un alto porcentaje de alaninas, concretamente un 22,4% (24 Ala), lo que es característico de este tipo de proteínas. El análisis de la secuencia proteica ha permitido localizar dos dominios transmembrana, cuatro posibles puntos de N-miristoilación, dos de fosforilación de la proteína quinasa C (uno de fosfoerina y uno de fosfotreonina), dos de fosforilación de la caseína quinasa II para fosfoerina, uno de N-glicosilación y dos de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc o GMPc.

```

1 gccattctccctcctcctcctcctcagttttctctctact
61 aacttcattcatttttagtgatatttttcatttactctcttaaaatggtaaaaaatgtggct
    aatgagagaat M V K N V A 6
121 gaatcacctcttgagaggaataacctggcttcccttggaacaagctggccatggccaag
    E S P L E R N N L A S L G N K L A M A K 26
181 cgctgttctcatgagggtgtaatagcaggagctaaggcagccgttggtgctactattgcc
    R C S H E G V I A G A K A A V V A T I A 46
241 actgccatcccaactatggctagtgcgaggatgctgccttgggcaagggtcaatctcaat
    T A I P T M A S A R M L P W A R A N L N 66
301 cacactgcacaagcgtctcataatcagcacagtggcaggagcggcatatttcattgtggct
    H T A Q A L I I S T V A G A A Y F I V A 86
361 gacaagaccgttttggcaactgctaggaggaattccttgggcaaattcttaacaatgac
    D K T V L A T A R R N S F G Q I S N N D 106
421 gcaTaaatggaatcactagcttggctttagttatatatggttattgggctttaaaaccaa
    A 107
481 ttattatgtaaacataccatctgatcctgatagataaataaagatgggtttacgtttcca
541 ttctaagagcacaagagctgtatgttcaaagatcagcttacatgaatgcaaattatcttc
601 cgtattaaatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 636

```

**Figura 36:** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del ADNc *CsENOD93*. Los cebadores empleados para la obtención de la secuencia se muestran en naranja y los utilizados en los análisis de qPCR están subrayados. En rojo se indican los codones de iniciación (ATG) y el de terminación (TAA). En la región promotora se localizan los motivos 3-AF1, caja AE, caja III y el motivo GAG (resaltado en rosa) y la caja TATA (en azul). Se representa en mayúsculas la secuencia de aminoácidos y en amarillo los dos dominios transmembrana.

En la región 5'UTR, hemos localizado algunas secuencias típicas de la región promotora (Fig. 36), como una caja TATA y dos secuencias de unión a elementos de respuesta a la luz denominadas caja AE (5'AGAACTT3') y caja III (5'CATTACTCT3'). En la hebra complementaria y solapando con la caja III, se localizaron otros dos elementos de respuesta a la luz que son el punto de unión 3-AF1 (5'TAAGAGAGGAA3') y el motivo GAG

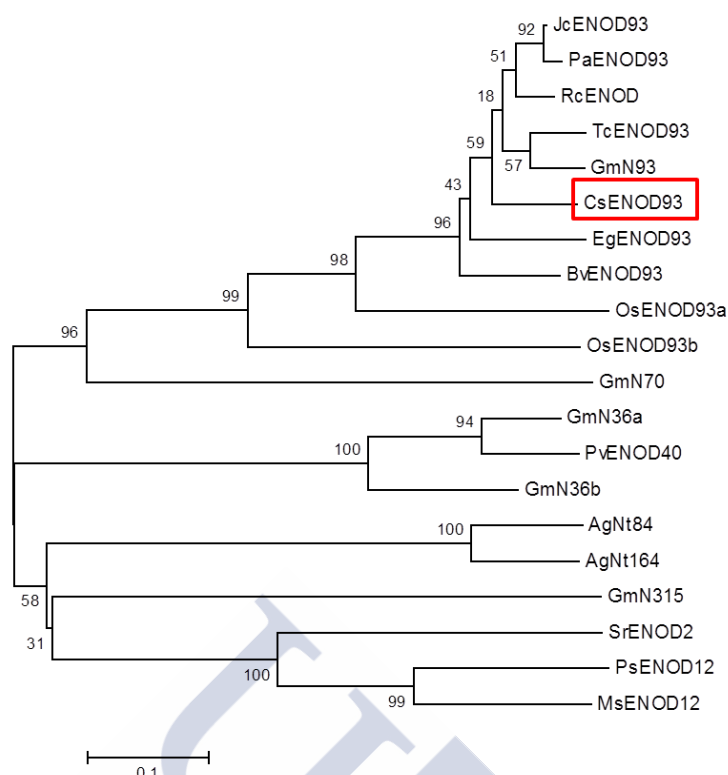
(5'AGAGAGT3'). El análisis mediante BLASTP mostró una alta homología de CsENDO93 con las “early nodulin”, proteínas de respuesta temprana en la formación de nódulos radiculares. Aunque estas proteínas se caracterizaron en el proceso de nodulación de leguminosas, también se encontraron genes homólogos en especies no leguminosas como se confirma en la Tabla 31. Aun así, como se muestra en el alineamiento (Fig. 37), CsEND093 presenta gran similitud con secuencias de especies alejadas filogenéticamente como la soja, el arroz y el ricino, en las cuales este gen ha sido caracterizado. Por último, realizamos los análisis filogenético con proteínas de otras especies de la familia de las nodulinas, que han sido caracterizadas en más detalle y con las que más adelante compararemos el patrón de expresión observado en el gen *CsENOD93* (Fig.38).

**Tabla 31:** Secuencias con alto grado de homología con la secuencia codificada por *CSENOD93*. El valor “Ident” indica el grado de homología y “e-valor” la probabilidad de que la homología sea debida al azar.

Proteína	Score	E-Valor
>gi 125630795 gb ABN47005.1  early nodulin 93 protein [Populus alba x Populus glandulosa]	87%	1e-55
>gi 802634600 ref XP_012078085.1  PREDICTED: early nodulin-93-like [Jatropha curcas]	87%	3e-55
>gi 702505663 ref XP_010039609.1  PREDICTED: early nodulin-93-like [Eucalyptus grandis]	81%	3e-51
>gi 731353413 ref XP_010688054.1  PREDICTED: early nodulin-93-like [Beta vulgaris subsp. vulgaris]	76%	2e-50
>gi 590577926 ref XP_007013368.1  Early nodulin-93 isoform 1 [Theobroma cacao]	80%	2e-50
>gi 15239541 ref NP_197966.1  early nodulin-related protein [Arabidopsis thaliana]	64%	5e-18



**Figura 37:** Alineamiento mediante clustalW2 de la secuencia aminoacídica deducida de *CsENOD93* con otros miembros de la familia ENOD93, incluyendo dos secuencias de arroz (Os), una de ricino (Rc) y una de soja (Gm). Sobre las secuencias se localiza el dominio ENOD93. Los números de acceso del GenBank de las secuencias utilizadas son: GmN93 (BAA02724.1), OsENOD93a (BAA33814.1), OsENOD93b (BAA33815.1) y RcRNOD93 (B9SEN5).



**Figura 38:** Árbol filogenético de la familia de proteínas ENOD93 de diferentes especies y otras familias proximas. Las dos primeras letras de cada secuencia corresponden a la especie, Ag: *Alnus glutinosa*; Bv: *Beta vulgaris subsp. vulgaris*; Cs: *Castanea sativa*; Eg: *Eucalyptus grandis*; Gm: *Glycine max*; Jc: *Jatropha curcas*; Os: *Oryza sativa Japonica*; Pa: *Populus alba x Populus glandulosa*; Ps: *Pisum sativum*; Pv: *Phaseolus vulgaris*; Rc: *Ricinus communis*; Sr: *Sesbania rostrata*; Tc: *Theobroma cacao*. La construcción del árbol se llevó a cabo con el programa MEGA6, por el método Neighbor-Joining (1000 réplicas con bootstrap). Los números de acceso del GenBank se especifican en la Tabla 12 (Material y Métodos).

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

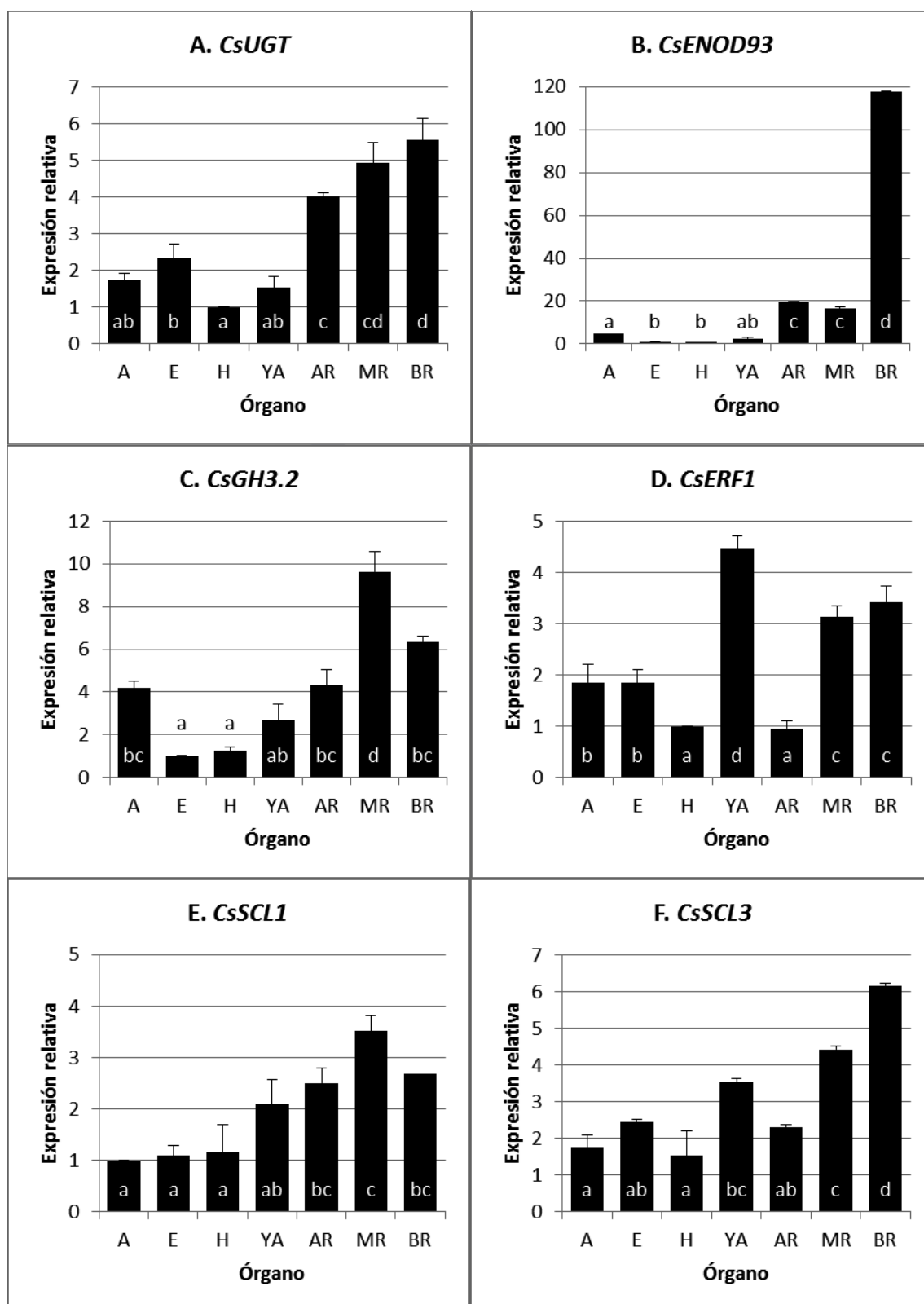
### 4.1. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN DIFERENTES ÓRGANOS

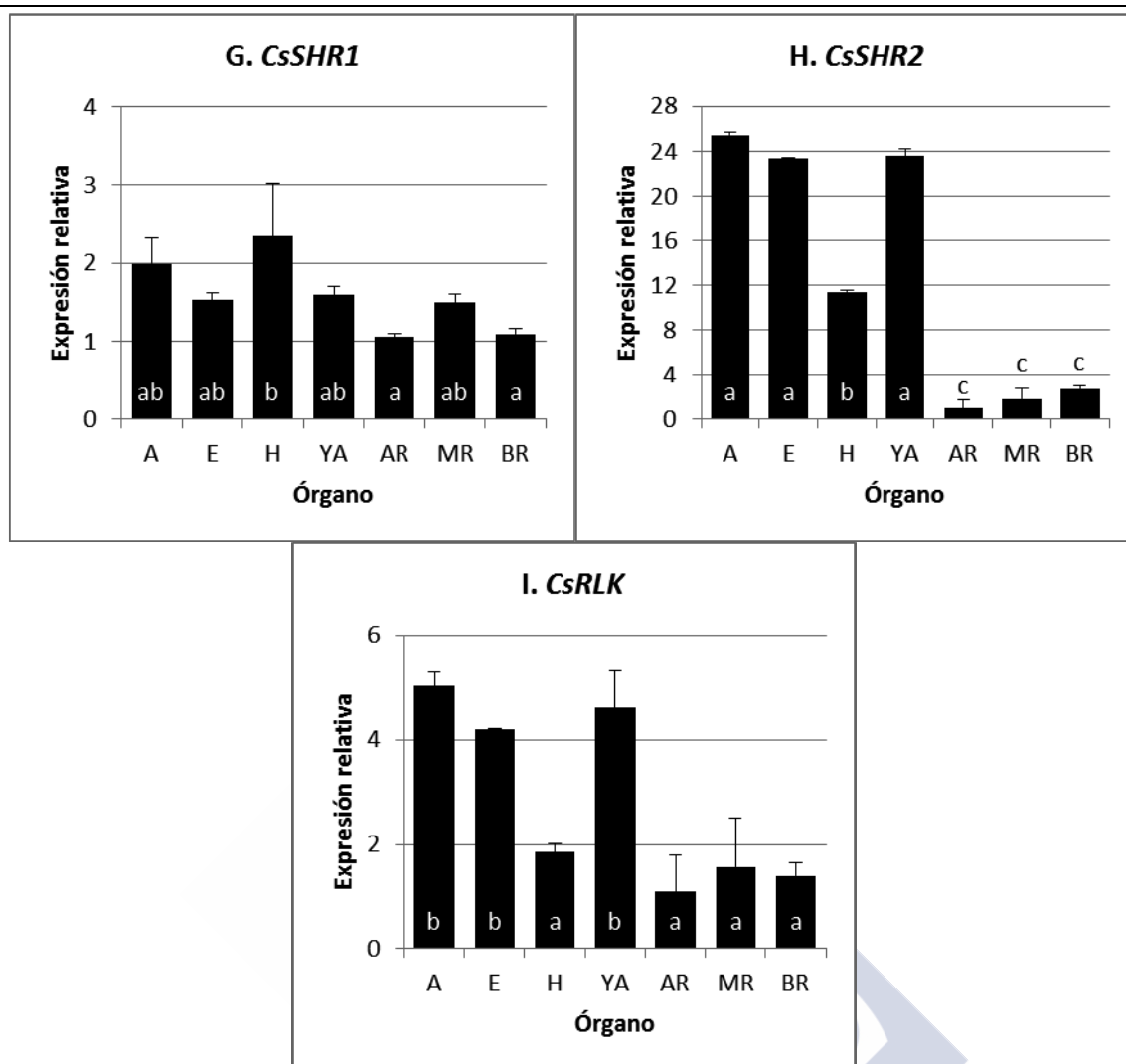
Para determinar el nivel relativo de los transcritos en los diferentes órganos, se recogieron brotes de la línea P2Rb al final del periodo de multiplicación y raíces desarrolladas en brotes tratados con AIB. A partir de los brotes se aislaron los ápices (incluyendo las primeras hojas no expandidas), las yemas axilares, los entrenudos y las hojas. Las raíces, recogidas a los 30 días tras su inducción, se dividieron en tres partes: zona basal o de diferenciación, zona media o de elongación y zona apical meristemática. Se aisló el ARN de dichas muestras y se analizó la expresión relativa de los genes mediante qPCR.

Como podemos observar en las gráficas (Fig. 39), los genes *CsUGT*, *CsENOD93*, *CsGH3.2*, *CsERF1*, *CsSCL1* y *CsSCL3*, se expresan predominantemente en raíces. Cabe señalar la elevada expresión del gen *CsERF1* en yemas axilares, en las cuales los genes *CsSCL1* y *CsSCL3* mostraron también una expresión moderadamente alta. Por el contrario, los niveles de los transcritos *CsRLK* y *CsSHR2* eran máximos en las partes aéreas del brote y significativamente superiores a los encontrados en raíces, salvo en el caso del transcrito *CsRLK* en hojas, que mostró niveles similares a los encontrados en las raíces. Finalmente el gen *CsSHR1* presentó niveles de expresión relativa muy similares en los diferentes órganos. Los genes *CsUGT* y *CsENOD93* mostraron niveles de expresión significativamente más altos en cualquiera de las zonas de la raíz que en las partes aéreas, con especial relevancia en el caso del *CsENOD93*. Cabe mencionar el elevado incremento en los niveles relativos de mensajero *CsENOD93* detectado en la parte basal de las raíces, con relación a las otras zonas, lo cual indica que este gen puede estar involucrado en el desarrollo de la raíz, probablemente en procesos asociados a su diferenciación. En el gen *CsUGT*, aunque las diferencias no son tan marcadas, también se observó un incremento paulatino en su expresión asociado al desarrollo de la raíz, con diferencias significativas entre la zona meristemática y la de diferenciación. El patrón de expresión del gen *CsSCL3* es similar al descrito para *CsUGT*, con un incremento progresivo y significativo en el nivel de transcrito hacia la zona basal de la raíz. Sin embargo, las diferencias entre los niveles de expresión de la raíz y los órganos aéreos fueron menos acusadas. Aunque los niveles de expresión más altos se observaron en la zona basal de la raíz, la zona apical y media tienen valores similares o incluso inferiores a otros órganos como las yemas axilares y los entrenudos. El patrón de expresión del gen *CsERF1* en la raíz es similar al del gen *CsSCL3*, asociado al crecimiento y la diferenciación de las mismas. Sin embargo como ya hemos mencionado, se detectaron niveles más altos de mensajero en las yemas axilares, lo que indica que también puede estar participando en su proliferación. Los genes *CsGH3.2* y *CsSCL1* mostraron un patrón de expresión similar, aunque con niveles de expresión diferentes, siendo mayores las diferencias entre los diferentes órganos en el caso del gen *CsGH3.2*.



En ambos casos, la zona media de la raíz presentó niveles de expresión significativamente más elevados que cualquiera de los órganos aéreos.





**Figura 39:** Expresión relativa de los genes *CsENOD93* (A), *CsUGT* (B), *CsERF1* (C), *CsGH3.2* (D) *CsSCL1* (E), *CsSCL3* (F), *CsSHR1* (G), *CsSHR2* (H) y *CsRLK* (I) en los diferentes órganos de brotes de castaño de origen juvenil (Rb). A: ápices; E: entrenudos; H: hojas; YA: yemas axilares; AR: zona apical de la raíz; MR: zona media de la raíz y BR: zona basal de la raíz. Los datos se normalizaron empleando como controles referentes la *actina*, la *tubulina* y la *ubiquitina*. Los niveles de expresión representan valores relativos a la muestra con valor más bajo de expresión en cada replicado biológico. Los valores se expresan como valor medio  $\pm$  error estándar de tres replicados biológicos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan y t de Student en el caso del gen *CsENOD93*.

Aunque los genes *CsRLK* y *CsSHR2* parecen mostrar un patrón similar, con niveles de expresión mayores en los órganos aéreos, los niveles alcanzados por el gen *CsSHR2* fueron mucho más elevados. En el caso de las partes aéreas, el nivel de expresión más bajo de ambos genes fue detectado en las hojas, llegando a valores similares a los de las raíces en el caso de *CsRLK*. Finalmente, el gen *CsSHR1* parece ser un gen ubicuo, ya que se expresó de forma similar en los diferentes órganos evaluados. Únicamente hemos detectado diferencias

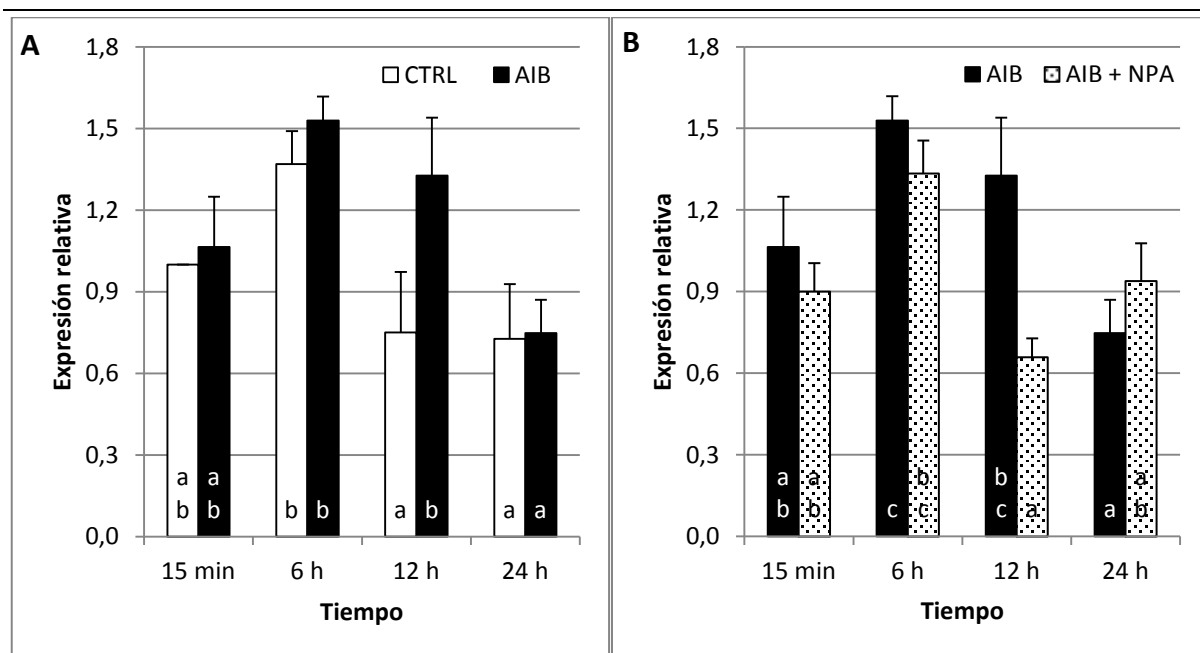
significativas en los niveles de transcrito entre las hojas y las zonas apical y basal de la raíz.

## 4.2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INDUCCIÓN Y DESARROLLO DE LAS RAÍCES ADVENTICIAS

### 4.2.1. *CsERF1* (*Castanea sativa Ethylene transcription factors1*)

Para analizar la expresión del gen en la inducción del EA se recogió la zona basal de los brotes a los 15 minutos, 6, 12 y 24 horas tras la aplicación de AIB. Mediante qPCR evaluamos los niveles de expresión de muestras tratadas con AIB, AIB y NPA y sin tratamiento hormonal (CTRL). Los niveles de expresión se evaluaron como expresión relativa respecto a la muestra control recogida a los 15 minutos.

Como se muestra en la Figura 40, los niveles de expresión del gen entre los diferentes tiempos y tratamientos no presentan apenas variaciones, ya que oscilaron entre valores de 0,66 y 1,53. En las muestras control, los niveles del transcrito experimentaron un descenso significativo a las 12 horas con respecto a los observados durante las 6 horas, y este descenso se mantuvo a las 24 horas. En las muestras tratadas con auxina, los niveles de expresión se mantuvieron relativamente constantes durante las primeras 12 horas, experimentando un descenso significativo a las 24 horas. El tratamiento auxínico provocó un aumento significativo de los niveles del transcrito a las 12 horas con relación a las muestras control. Por otra parte, tras el tratamiento con NPA se detectaron niveles del transcrito relativamente más bajos que los de las muestras tratadas con auxina, justo a las 12 horas (Fig. 40 A y B). Estos resultados sugieren que el gen *CsERF1* está regulado por el tratamiento hormonal, con una respuesta puntual y transitoria a la auxina a las 12 horas. De acuerdo al análisis estadístico solo existe interacción entre el tiempo y el tratamiento con NPA, pero no con el tratamiento con AIB ( $P \leq 0,05$ ) (Tabla 32).

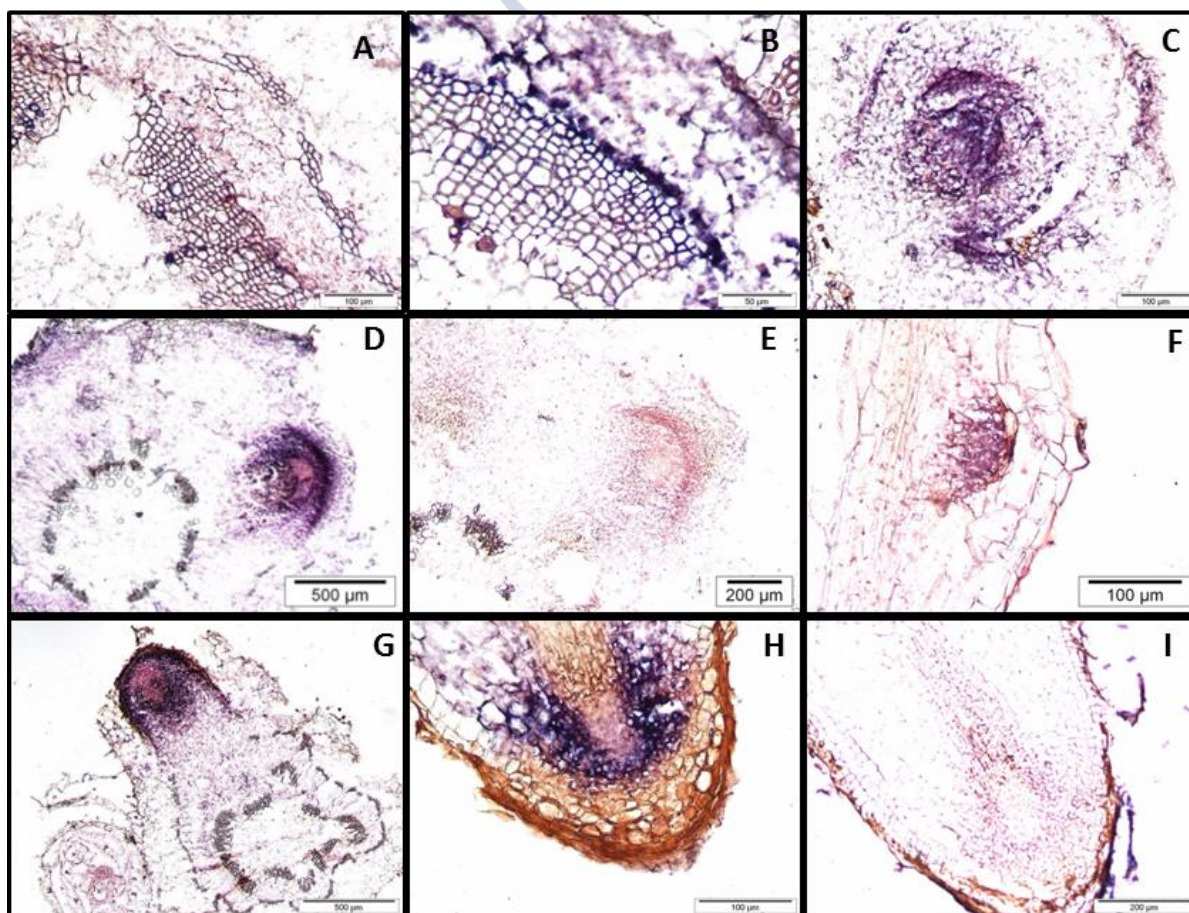


**Figura 40:** Niveles de expresión relativa del gen *CsERF1* en las bases de los brotes procedentes de renuevos basales (P2Rb) durante las primeras 24 h tras los tratamientos con AIB (4,9 mM/1min) y AIB (4,9 mM/1min) + NPA (50  $\mu$ M/5 d), y en sus respectivos controles (CTRL) sin tratamiento hormonal. Se empleó como calibrador la muestra CTRL 15 min. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de tres replicados biológicos. Las diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 32:** Efecto del tiempo y del tratamiento con AIB y NPA en los niveles de expresión génica del gen *CsERF.1*

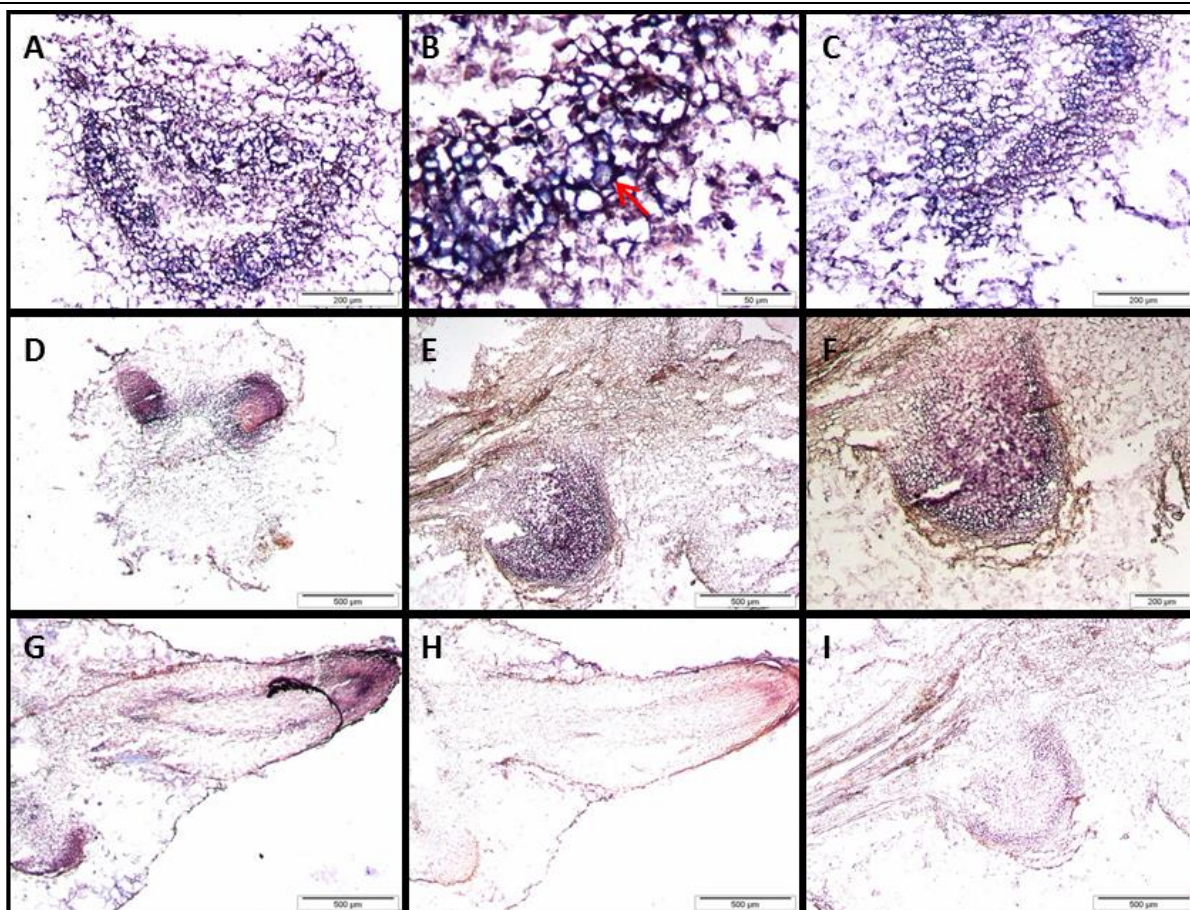
Fuente de variación	g.l.	CM	F	Sig. (0,05)
<b>Tiempo</b>	3	0,512	6,603	0,004
<b>Tratamiento AIB</b>	1	0,253	3,254	0,090
<b>Interacción</b>	3	0,097	1,247	0,327
<b>Error</b>	16	0,078		
<b>Tiempo</b>	3	0,391	6,840	0,04
<b>Tratamiento NPA</b>	1	0,260	4,550	0,049
<b>Interacción</b>	3	0,186	3,263	0,049
<b>Error</b>	16	0,057		

Para determinar si el incremento en el nivel de mensajero observado a las 12 horas tras el tratamiento de auxina, puede estar asociado a tejidos o células involucradas en la iniciación de RAs, hemos analizado su localización tisular mediante hibridación *in situ*. La expresión del gen *CsERF1* en las bases de las muestras tratadas con auxina se localizó preferentemente en la zona del cambium vascular (Fig. 41 B), mientras que en las muestras control no tratadas, la expresión es menor y difusa (Fig. 41 A). Tras 10 y 14 días del tratamiento con auxina, se observa la presencia de primordios radiculares con una abundante expresión del gen, más intensamente en las células periféricas del mismo y en las



129





**Figura 42:** Localización *in situ* del transcrito *CsERF1* durante la inducción y desarrollo de raíces adventicias en peciolo de hojas de la línea P2Rb tratadas con AIB 25  $\mu$ M durante 3 (A, B) y 5 días (C, D, E, F, G, H, I). Secciones transversales de muestras recogidas a los 3 días (A, B), a los 5 días (C) y a los 10 días (E, F, G, H, I) mostrando los primordios de raíz (D, E, F, I) y la raíz emergiendo (G, H). Nótese la ausencia de señal en las muestras hibridadas con la sonda sentido (H, I).

La localización de la expresión del gen *CsERF1* también se evaluó durante la inducción y desarrollo de RAs en hojas (Fig. 42), donde el proceso ocurre de forma similar al de los brotes. A los 3 (Fig. 42 A y B) y 5 días (Fig. 42 C) tras la aplicación del tratamiento auxínico, el transcrito se focalizó más en el cilindro vascular, con una señal intensa y específica asociada a células en división observadas a los 3 días tras el tratamiento con auxina (Fig. 42 B). Durante el desarrollo de los primordios (Fig. 42 D, E y F), la localización del mensajero mostró un patrón similar al descrito en brotes, con una señal muy intensa en las capas externas y una ligera expresión en la zona central del meristemo. De forma similar, cuando la raíz ya ha emergido (Fig. 42 G y H) la señal se focaliza en el ápice, en las células madre de la epidermis, el córtex y la endodermis. Las muestras hibridadas con la sonda sentido no mostraron señal (Fig. 42 H e I).

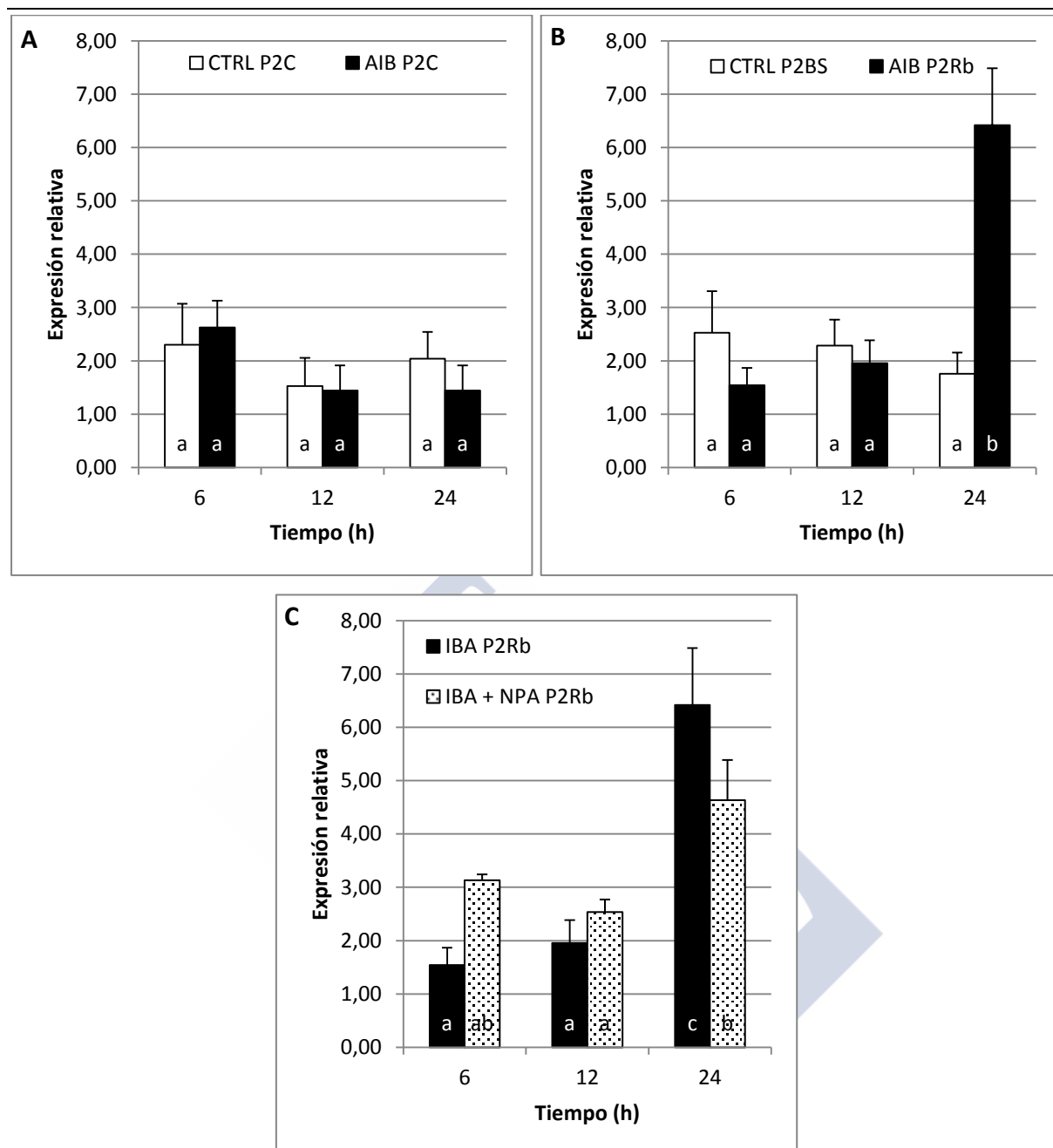


#### 4.2.2. *CsSCL1* (*Castanea sativa* SCARECROW-like 1)

Con el fin de corroborar la eficiencia del sistema experimental desarrollado en hojas para el estudio de genes implicados en el proceso de EA e inducidos por auxina, se analizó la expresión del gen *CsSCL1* en dicho sistema. En trabajos previos, el análisis de la expresión del gen *CsSCL1* ya se había llevado a cabo en el sistema de brotes (Vielba *et al.*, 2011). En el presente trabajo se estudió la dinámica de expresión del gen durante los primeros momentos del proceso de inducción del enraizamiento teniendo en cuenta el estado ontogenético del material. Además, en el caso de las hojas de P2Rb, se analizó el efecto de la aplicación del NPA en la expresión del gen.

En los explantos de origen adulto (Fig. 43 A), con muy baja o nula capacidad de enraizamiento, los niveles de expresión del gen se mantuvieron estables independientemente del tiempo y del tratamiento (AIB o CTRL). Por el contrario, en las hojas de la línea P2Rb (Fig. 43 B), observamos un pico de expresión a las 24 horas en las muestras tratadas con auxina, y que corresponde al momento en que teóricamente tiene lugar la desdiferenciación y adquisición del nuevo destino celular hacia células iniciales de raíz. Por lo tanto, la expresión del gen en respuesta a la auxina es diferente en función del estado ontogenético del material. La aplicación de NPA a las hojas tratadas con auxina, provocó una reducción significativa del pico de expresión del gen *CsSCL1* observado a las 24 horas en las muestras tratadas con AIB. Cabe recordar que como hemos visto en los apartados 1.4 y 1.5, el porcentaje de hojas enraizadas se redujo tras la aplicación de NPA. Las diferencias observadas en el material juvenil se deben a la interacción entre el tiempo y el tratamiento (Tabla 33). Estos datos muestran una correlación entre la inducción del gen por AIB a las 24 horas y la inducción del enraizamiento, así como entre el efecto inhibitor del NPA en el enraizamiento y una reducción en la expresión génica.

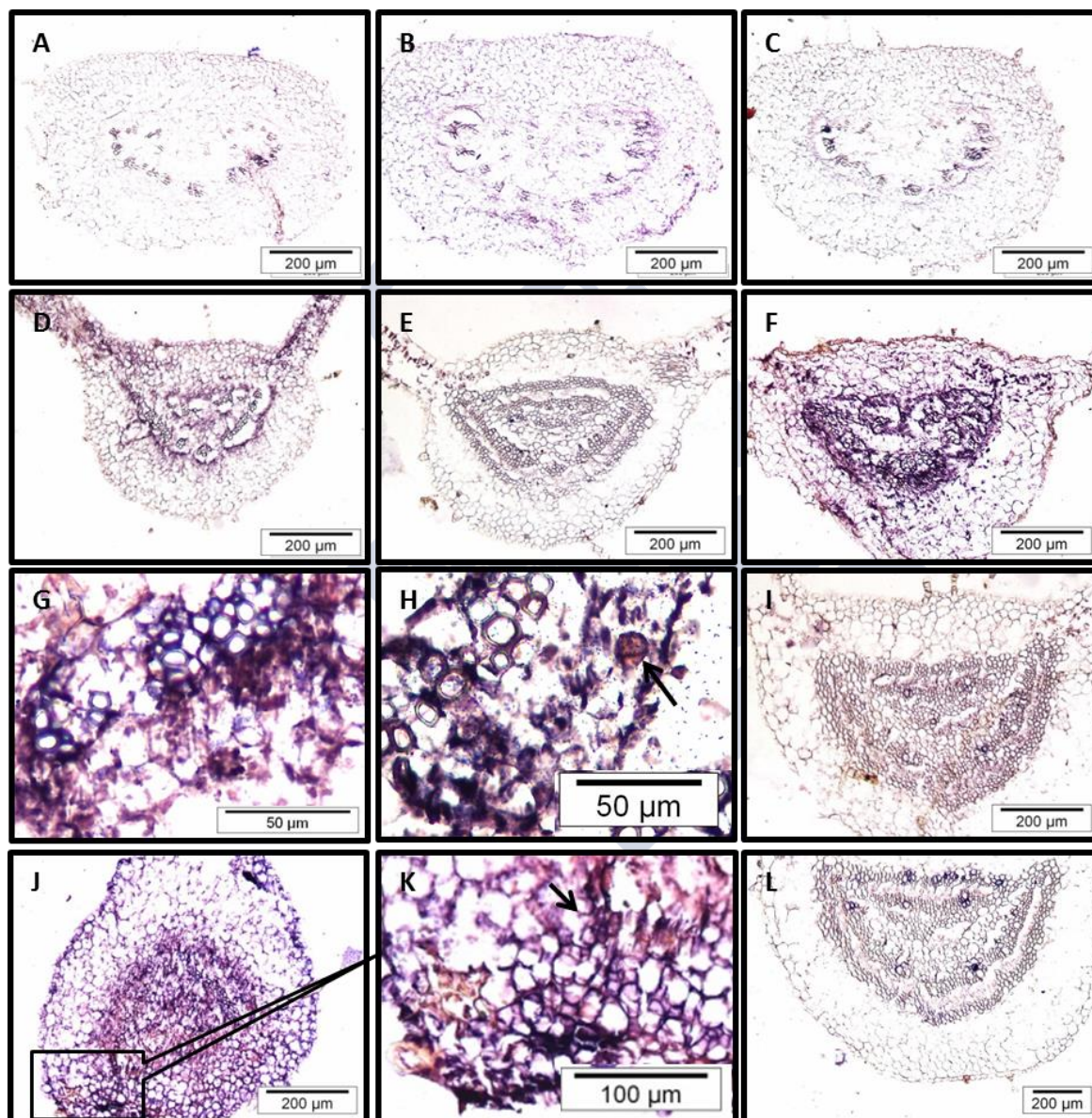
Los estudios de localización del gen *CsSCL1* mediante hibridación *in situ*, durante la inducción de RAs en hojas (Fig. 44) mostraron una expresión relativamente baja en las muestras de P2C, con una señal difusa tanto en los controles (Fig. 44 B) como en las muestras tratadas con AIB (Fig. 44 C). Por el contrario, las secciones de P2Rb tratadas con AIB mostraron un incremento considerable en la señal de hibridación (Fig. 44 D, F, J). Este incremento de la señal fue ya evidente a las 12 horas, localizada predominantemente en las células del cambium (Fig. 44 D), haciéndose extensiva a la zona del floema y células interfasciculares del parénquima vascular que rodea a los haces del xilema, después de 24



**Figura 43:** Niveles de expresión relativa del gen *CsSCL1* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras representan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan. (B, C) Los niveles de expresión del material juvenil dependen de la interacción entre el tiempo y el tratamiento ( $P \leq 0,05$ ).

horas de tratamiento auxínico (Fig. 44 F). Las secciones de los respectivos controles (sin tratamiento con AIB) no mostraron señal de hibridación (Fig. 44 E). En las muestras tratadas con AIB y NPA durante 24 horas, la señal de hibridación disminuyó considerablemente (Fig. 44 I), concretamente en aquellos tipos celulares y tejidos asociados con la formación de

primordios, en los que la expresión se inducía por auxina (Fig. 44 F vs I). Esta localización específica del transcrito en células asociadas con la iniciación de primordios de raíz, se observó también en las primeras divisiones encontradas tanto a las 24 (Fig. 44 G y H) como a las 72 horas (Fig. 44 J y K) tras el tratamiento con AIB, que muestran una señal muy intensa de hibridación. Algunas de estas divisiones podrían tratarse de las primeras divisiones asimétricas que darán lugar al primordio radicular (como indicamos con una flecha en las Figura 44 H y K). En las muestras 44 A y L hibridadas con la sonda sentido, no se detectó señal de hibridación.

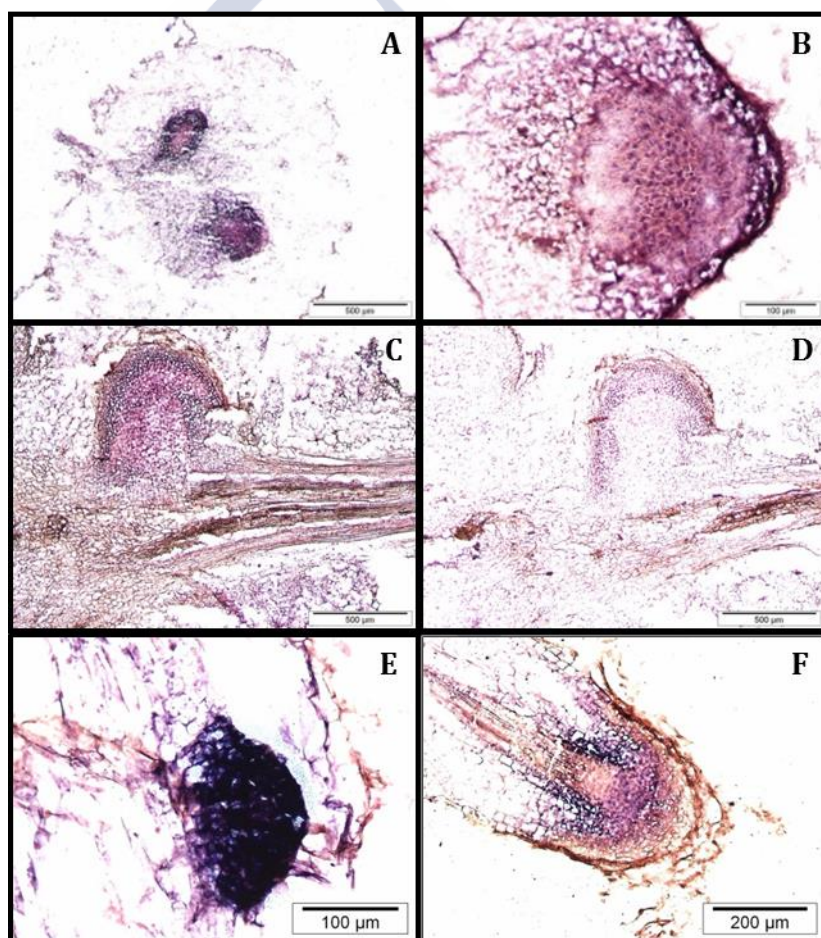


**Figura 44:** Localización *in situ* del transcrito del gen *CsSCL1* en secciones de hojas de la línea P2C (A, B, C) y P2Rb (D, E, F, G, H, I, J, K, L) tratadas con AIB 0  $\mu$ M (B, E), con AIB 25  $\mu$ M (A, C, D, F, G, H, J, K), y con AIB 25  $\mu$ M y NPA 50  $\mu$ M, simultáneamente (I, L). Las hojas fueron recogidas a las 12 (D), 24 (A, B, C, E, F, G, H, I, L) 72 horas (J, K) después de iniciar el tratamiento. Nótese la ausencia de señal en las muestras hibridadas con la sonda sentido (A, L). Indicadas con una flecha aparecen las posibles primeras divisiones asimétricas que darán lugar a los primordios radiculares.



De nuevo estos resultados indican que el gen *CsSCL1* participa en la inducción del proceso de EA, y su patrón de expresión está determinado por el estado ontogenético del material independientemente del tipo de explanto empleado.

Los resultados de la expresión espacial del gen durante la formación de los primordios y en el desarrollo de la raíz se muestran en la Figura 45. Se observa una señal intensa en los primordios de RAs (Fig. 45 A, B y C), así como en las primeras etapas de desarrollo de primordios de RLs (Fig. 45 E). También podemos ver en las muestras recogidas a los 10 días tras el tratamiento con AIB, la conexión de los primordios con el tejido vascular a partir del cual se originaron (Fig. 45 A, C, D). En etapas más avanzadas del desarrollo de la raíz, el ARNm se localizó en el ápice de la raíz (Fig. 45 F), concretamente en el CQ, en las células iniciales del córtex y endodermis, y en la columela. En la muestra D de la Figura 45, hibridada con la sonda sentido no se detectó señal de hibridación.



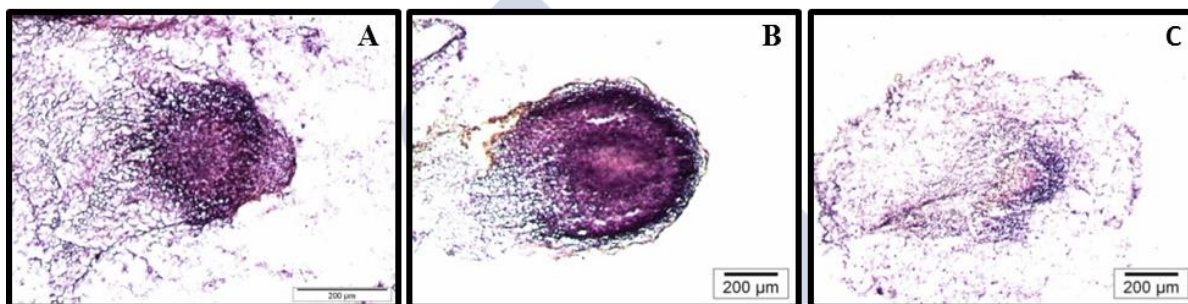
**Figura 45:** Localización *in situ* del transcrito *CsSCL1* durante la iniciación y desarrollo de primordios radiculares y en el ápice de la raíz. Secciones transversales (A y B) y longitudinales (C, D) de peciolo a los 10 días tras la inducción del enraizamiento donde localizamos primordios de raíces adventicias. Secciones longitudinales de raíz mostrando un primordio de raíz lateral (E) y el ápice de la raíz (F). Nótese la ausencia de señal en las muestras hibridadas con la sonda sentido (D).

**Tabla 33:** Efecto del tiempo y del tratamiento con AIB y NPA en los niveles de expresión génica

GEN	Fuente de variación	P2C (A) CTRL vs AIB				P2Rb (B) CTRL vs AIB				P2Rb (C) AIB vs NPA			
		g.l.	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F
<i>CsSCL1</i>	Tiempo	2	0.637	0.581	0.574	8.084	6.652	0.011	20.927	20.344	0.000		
	Tratamiento	1	0.233	0.213	0.653	5.616	4.621	0.053	0.072	0.070	0.795		
	Interacción	2	1.081	0.989	0.401	14.274	11.745	0.001	4.482	4.357	0.038		
	Error	12	1.096			1.215			1.029				
<i>CsRLK</i>	Tiempo	2	0.516	1.978	0.181	0.035	0.444	0.652	0.039	0.197	0.824		
	Tratamiento	1	0.030	0.115	0.740	0.019	0.244	0.630	1.047	5.356	0.039		
	Interacción	2	0.497	1.906	0.191	0.058	0.740	0.497	0.058	0.297	0.748		
	Error	12	0.261			0.078			0.195				
<i>CsGH3.2</i>	Tiempo	2	5,715	0,419	0,667	11,462	0,255	0,779	45,589	0,758	0,490		
	Tratamiento	1	944,677	69,280	0,000	5763,636	128,231	0,000	2158,874	35,88	0,000		
	Interacción	2	3,997	0,293	0,751	27,152	0,604	0,562	16,591	0,276	0,764		
	Error	12	13,636			44,947			60,156				

En la Figura 46 se muestra el efecto del NPA en la expresión del gen durante el desarrollo de los primordios de raíz, cuyo efecto inhibitor a nivel fisiológico ya se describió en el

apartado 1.5. En las muestras tratadas exclusivamente con AIB el transcrito se localizó en todo el primordio, pero en mayor abundancia en las capas externas que en la zona central y en la incipiente columela (Fig. 46 A). Un patrón de expresión similar se observó en las pocas raíces que se desarrollaron cuando se aplicó NPA y AIB simultáneamente, aunque en este caso aún no se evidenció la presencia de la columela (Fig. 46 B). De acuerdo con el retraso que tiene lugar en el desarrollo del primordio, cuando el NPA se aplicó tras el tratamiento con AIB, el transcrito se localizó con una señal baja y difusa en las células periféricas del meristemoide incipiente (Fig. 46 C). Por lo tanto, estos datos apuntan a que el gen *CsSCL1* participa en el control del establecimiento del patrón radial del ápice de la raíz y en el mantenimiento del CQ y que el NPA altera el patrón de expresión del gen durante el desarrollo radicular.



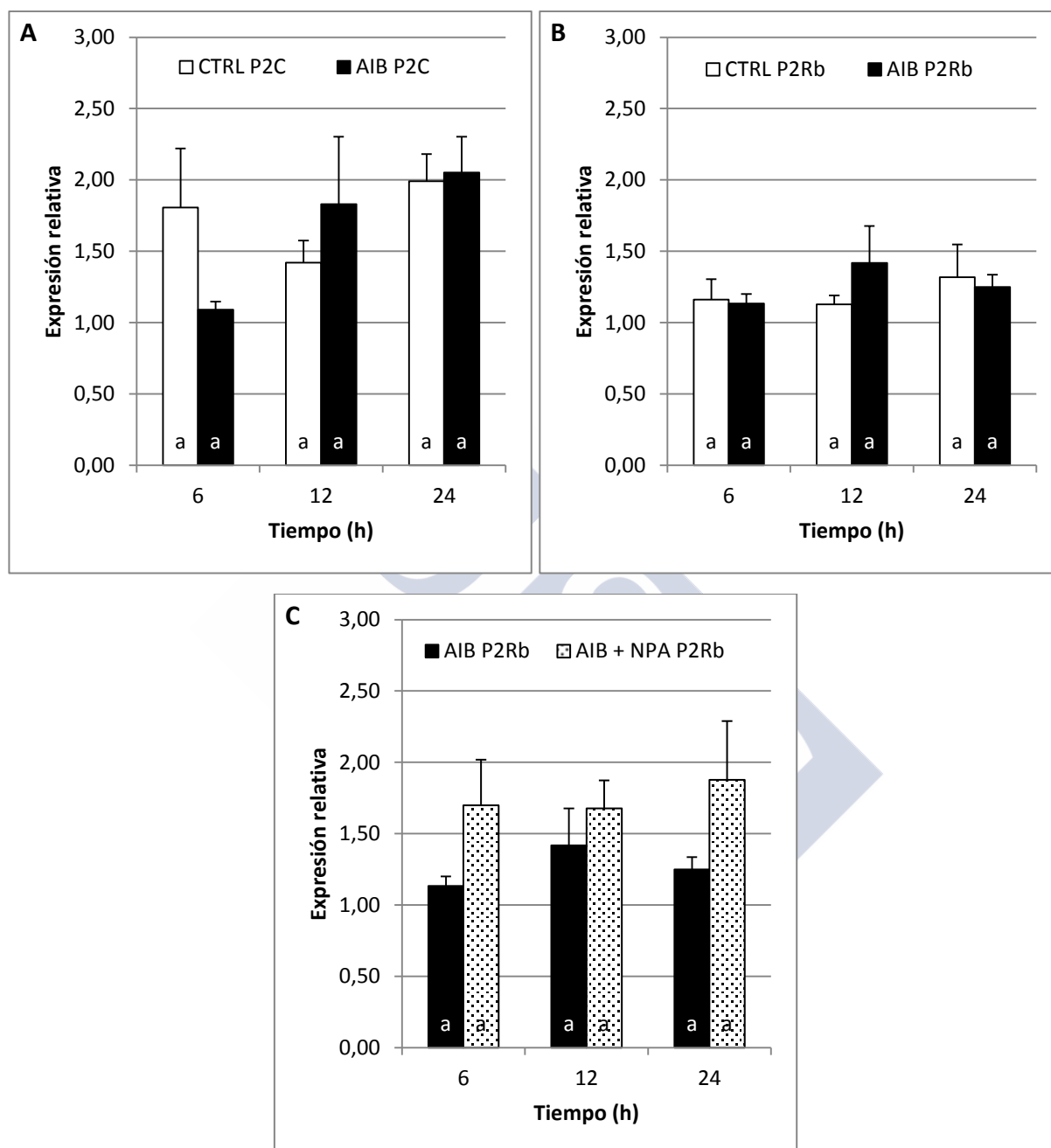
**Figura 46:** Efecto del NPA sobre la expresión del gen *CsSCL1* en el desarrollo de primordios en hojas de castaño. Las muestras fueron recogidas a los 10 días tras el inicio del tratamiento con AIB durante 5 días (A) con AIB y NPA simultáneamente durante 5 días (B) y con AIB durante 5 días y posteriormente transferidas a medio con NPA otros 5 días (C).

#### 4.2.3. *CsRLK* (*Castanea sativa* Receptor-like kinase)

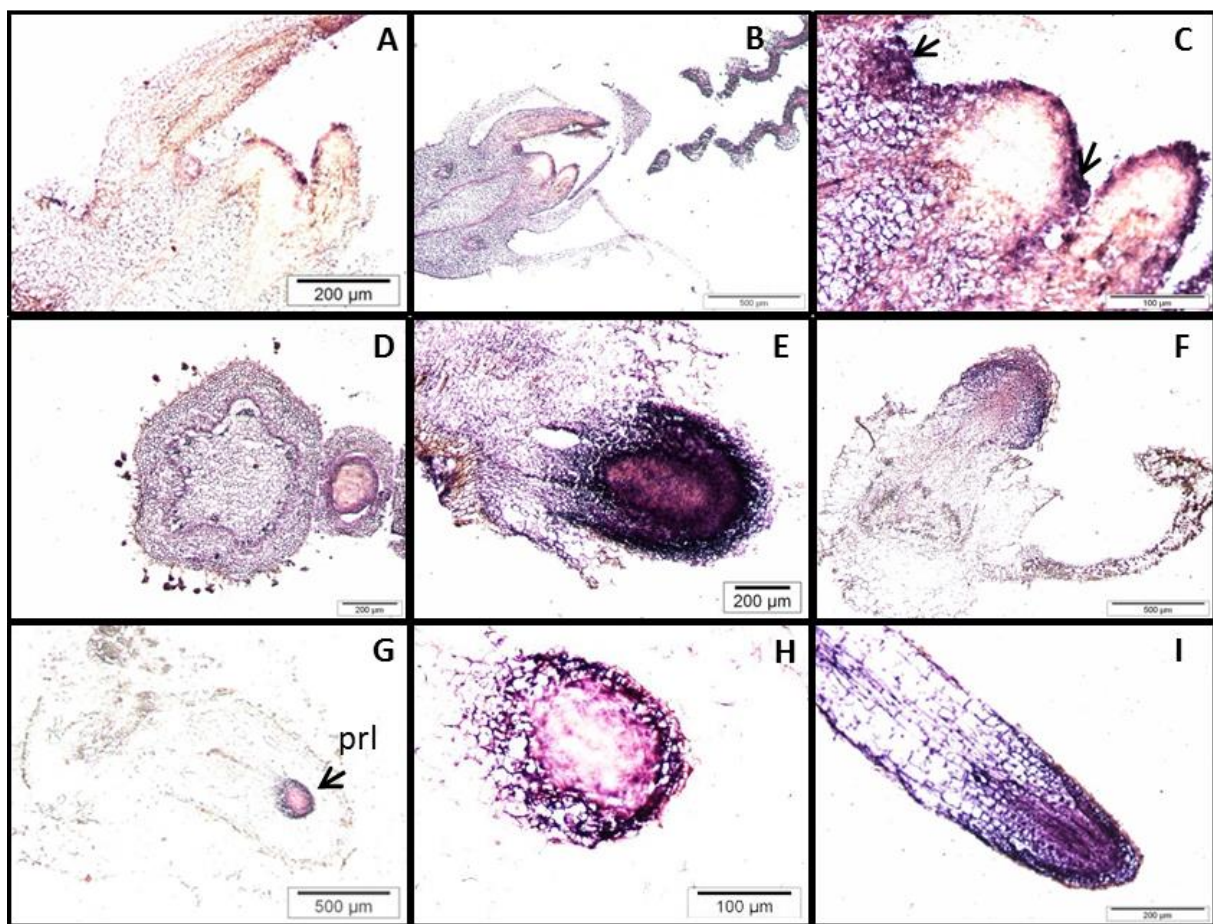
Para estudiar la posible participación del gen *CsRLK* en el EA, también se analizó mediante qPCR la expresión relativa del gen en el sistema de hojas, utilizando las mismas muestras, tratamientos y tiempos descritos en el caso del gen *CsSCL1*. Como se muestra en las Figura 47, el gen *CsRLK* no es inducible por la aplicación de auxina exógena (25  $\mu$ M) durante las primeras 24 horas en ninguna de las líneas (P2Rb y P2C), ya que los niveles de expresión en las muestras control y tratadas con AIB no mostraron diferencias significativas (Fig. 47 A y B). De manera similar, el tratamiento con NPA tampoco afectó significativamente a los niveles de expresión génica de las muestras de la línea P2Rb tratadas con AIB (Fig. 47 C). Estos resultados sugieren que el gen no está inducido ni regulado por auxinas, al menos durante las primeras 24 horas, y que



responde de forma similar independientemente del estado ontogenético del material. Por ello, aunque de nuevo se evaluó la interacción entre el tiempo y el tratamiento, esta no afecta a la expresión génica (Tabla 33).



**Figura 47:** Niveles de expresión relativa del gen *CsRLK* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Para cada parámetro, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).



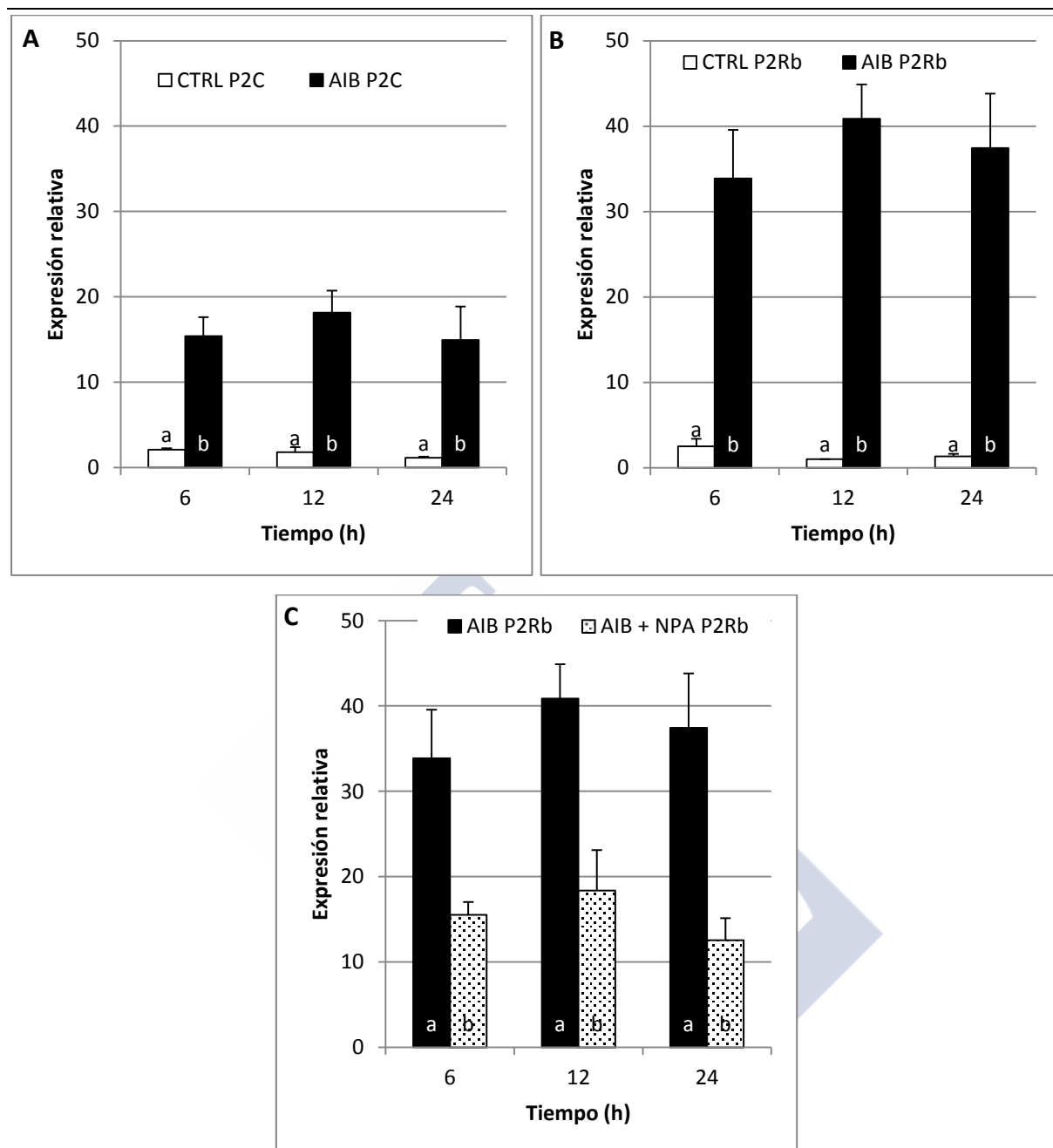
**Figura 48:** Hibridación *in situ* del transcrito del gen *CsRLK*. (A, B y C) Sección longitudinal del ápice de un brote. (D) Sección transversal del tallo mostrando una yema axilar. (E, F y G) Sección transversal del peciolo de hojas con un primordio (E), una raíz adventicia emergente (F) y del que emerge una raíz adventicia mostrando un primordio de raíz lateral (prl). (H) Primordio de la raíz lateral con más aumento. (I) Sección longitudinal del ápice de la raíz. Nótese la ausencia de señal en la muestra hibridada con la sonda sentido (A). Las flechas en C muestra una yema axilar (izquierda) y el inicio de primordios foliares (derecha).

El análisis realizado mediante qPCR mostró mayores niveles de expresión del gen *CsRLK* en las partes aéreas de la planta (ápice, entrenudos y yemas axilares) que en las raíces. En la Figura 48 se muestra la localización del transcrito *CsRLK* en el ápice del brote (Fig. 48 A, B y C), en las yemas axilares (Fig. 48 D), en los primordios de RAs (Fig. 48 E) y RLs (Fig. 48 G y H), durante el desarrollo de los primordios (Fig. 48 F) y en el ápice de la raíz (Fig. 48 I). A lo largo del tallo, el gen mostró una expresión basal relativamente elevada y generalizada (Fig. 48 B y D). En el ápice del brote, no se localizaron transcritos *CsRLK* en la zona central del meristemo apical, pero sí de manera intensa y muy localizada en la protodermis (Fig. 48 C). En las yemas axilares y al inicio de su desarrollo, también detectamos una fuerte expresión del gen (Fig. 48 C, flecha izquierda), al igual que en los primordios foliares incipientes (Fig. 48 C, flecha derecha). A

medida que progresa el desarrollo de las yemas axilares, la señal se localizó en las capas más externas de la misma, la túnica, con una expresión muy baja o nula en el meristemo central (Fig. 48 D). Este patrón de expresión se reproduce en los primordios de RLs, en los cuales la señal se localizó en las capas externas del meristemo (Fig. 48 G y H). Concordando con los niveles bajos detectados mediante qPCR en raíces y hojas, la localización del transcrito en estos órganos es muy baja (Fig. 48 E, F, G, I vs Fig. 39 I), aunque sí se detectaron niveles muy elevados en los primordios de RAs (Fig. 48 E) y en la parte apical de la raíz (Fig. 48 F e I). La Figura 48 A muestra ausencia de señal en las muestras hibridadas con la sonda sentido.

#### 4.2.4. *CsGH3.2 (Castanea sativa Gretchen Hagen 3.2)*

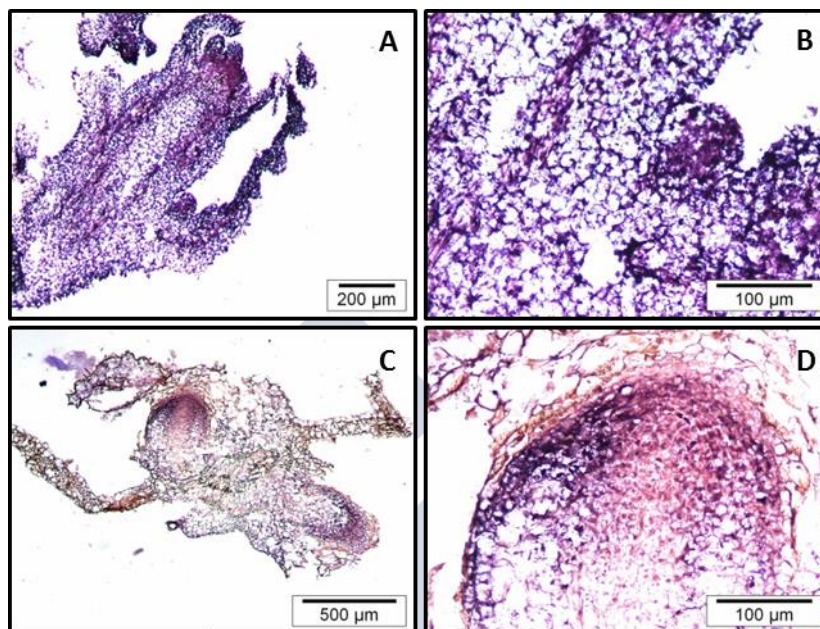
Utilizando el mismo sistema de hojas evaluamos, mediante qPCR, los niveles de expresión del gen *CsGH3.2* durante la inducción de RAs. Las muestras de las líneas P2Rb y P2C mostraron un fuerte incremento ( $P \leq 0,01$ ) de los niveles de expresión del gen en respuesta a la auxina durante las primeras 24 horas analizadas (Fig. 49 A y B). Aunque en ambas líneas el gen se indujo por auxina, esta inducción fue al menos dos veces mayor en el material juvenil con alta capacidad de enraizamiento que en el adulto (línea P2C). El mayor incremento observado fue a las 12 horas, momento en el que los niveles detectados en las muestras P2Rb tratadas con AIB alcanzaron niveles 40 veces superiores a los de las muestras control. El tratamiento con NPA redujo significativamente los niveles de expresión de las muestras de P2Rb, con respecto a las tratadas solamente con AIB (Fig. 49 C), alcanzando niveles intermedios a los detectados en las muestras control y en las tratadas con auxina y niveles similares a los de las muestras P2C tratadas con auxina. Estos resultados muestran que el gen *CsGH3.2* se induce por auxina, de forma distinta en material juvenil y adulto y esta inducción es parcialmente reversible mediante el tratamiento con NPA en el material juvenil. En la Tabla 33 se muestra que estas diferencias no se deben a la interacción entre el tiempo y el tratamiento.



**Figura 49:** Niveles de expresión relativa del gen *CsGH3.2* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y de P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test t de Student.

La localización del transcrito en ápices de brotes y durante el desarrollo de primordios de RAs se muestra en la Figura 50. El gen se expresa abundantemente en la parte apical del brote, pero más intensamente en el ápice y primordios de yemas axilares, así como también en los primordios foliares (Fig. 50 A y B).

Durante el enraizamiento, la señal es casi ausente en los tejidos de las hojas no involucrados en el enraizamiento (Fig. 50 C), con localización específica en las células iniciales de la epidermis, el córtex y la endodermis del primordio de raíz (Fig. 50 C y D) y de forma más tenue en la parte central del meristemo que dará lugar a la estela.



**Figura 50:** Localización *in situ* del transcrito *CsGH3.2*. (A, B) Sección longitudinal del ápice de un brote. (C, D) Sección transversal una hoja mostrando la presencia de primordios de raíces adventicias.

#### 4.2.5. Otros genes caracterizados

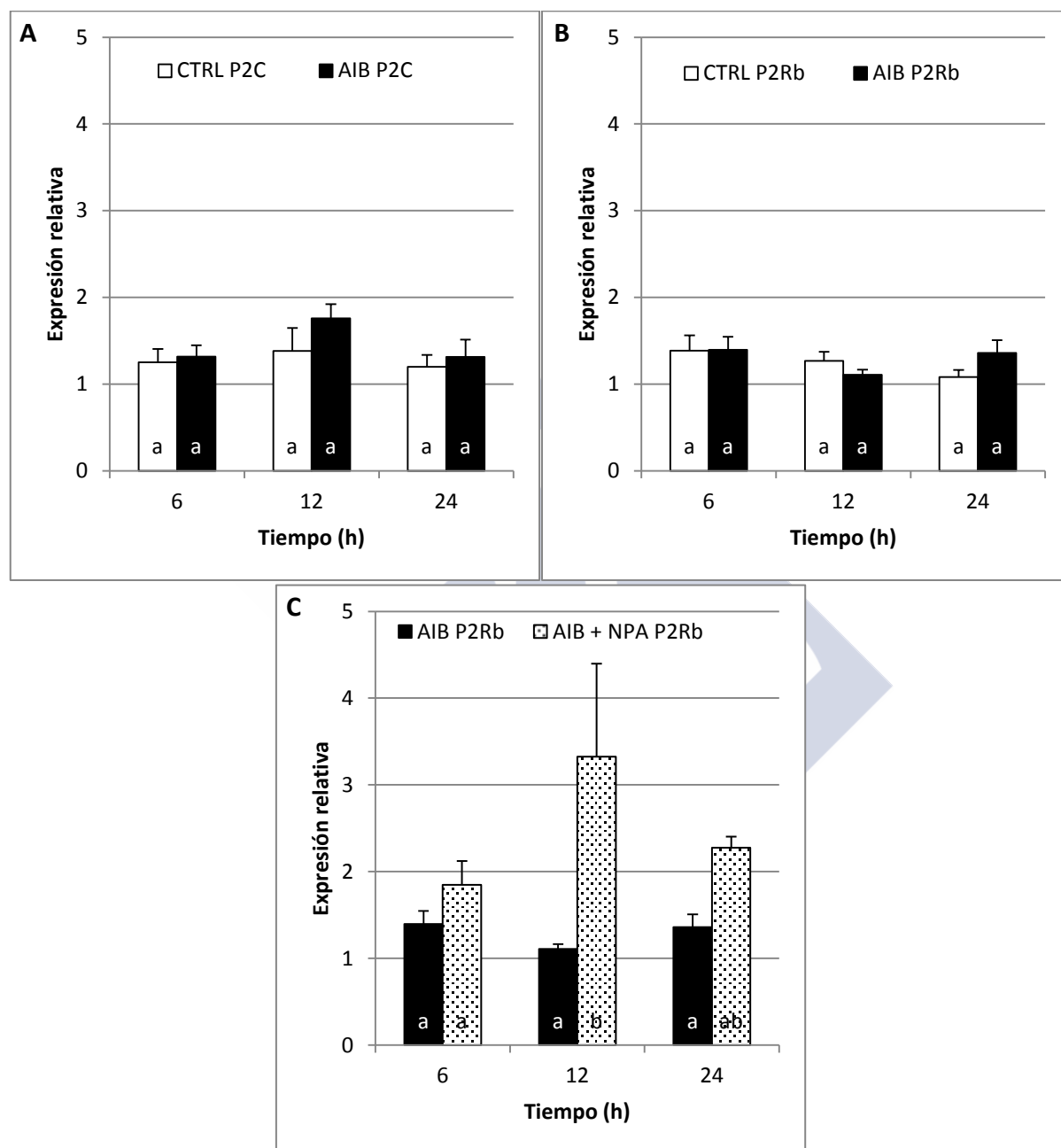
En este apartado, se presentan los resultados del análisis mediante qPCR de los genes *CsSCL3*, *CsSHR1*, *CsSHR2*, *CsENOD93* y *CsUGT*. El estudio se llevó a cabo en el sistema de hojas, durante la las primeras 24 horas, para evaluar su participación en la inducción del EA de castaño. Los tratamientos utilizados en la inducción son los ya descritos en los apartados anteriores: muestras control y muestras tratadas con AIB de las dos líneas (Rb y C) y muestras de la línea Rb tratadas con AIB y NPA simultáneamente.

##### 4.2.5.1. *CsSCL3* (*Castanea sativa* SCARCROW-like 3)

Como se muestra en la Figura 51, el gen *CsSCL3* no responde al tratamiento auxínico en ninguna de las dos líneas de cultivo (Fig. 51 A y B), manteniendo los niveles de expresión constantes a lo largo de las primeras 24 horas en todas las muestras. Por lo tanto, en lo que respecta a este análisis, la expresión no está determinada por el estado ontogenético del



individuo ni por la aplicación exógena de auxina. Sin embargo, la aplicación de NPA incrementó los niveles de expresión génica de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) a las 12 horas en las muestras tratadas con AIB de la línea P2Rb (Fig. 51 C). Teniendo en cuenta que la aplicación de auxina exógena no modificó los niveles de expresión del gen, cabe pensar que el efecto inductor del NPA no se produce a través de la ruta de señalización auxínica.



**Figura 51:** Niveles de expresión relativa del gen *CsSCL3* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y de P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan.



A partir de estos resultados no podemos inferir si el gen está participando o no en la fase de inducción del EA al menos en las 24 horas evaluadas. En la Tabla 34 confirmamos que no hay una interacción entre el tiempo y el tratamiento en la regulación de los niveles de expresión génica y que solo el tratamiento de NPA generó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados.

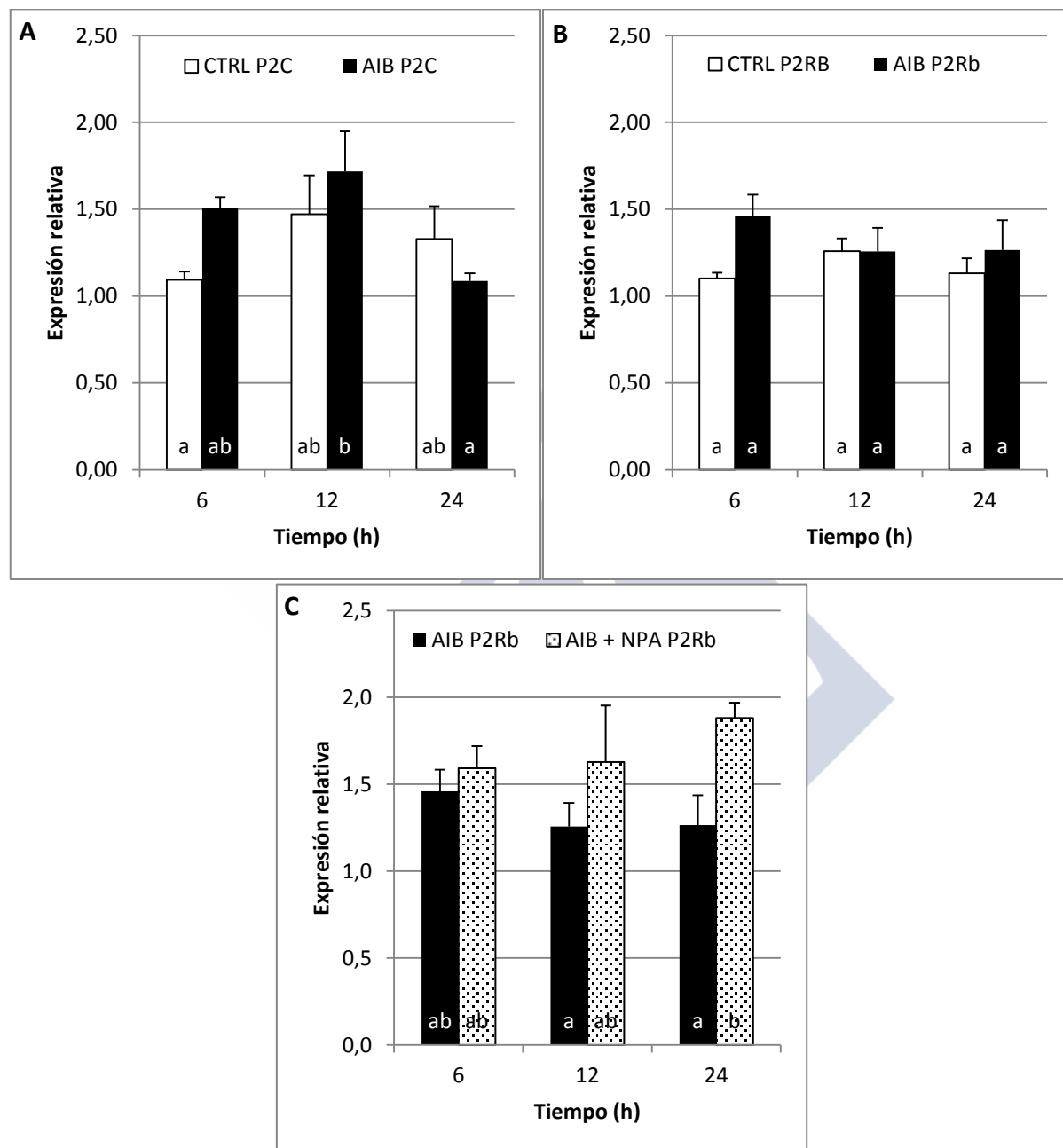
#### 4.2.5.2. *CsSHR1* (*Castanea sativa* *SHORT ROOT 1*)

El gen *CsSHR1* mostró ligeras variaciones en los niveles de expresión a lo largo de las 24 horas evaluadas en la línea P2C (Fig. 52 A), sin diferencias significativas en cada tiempo concreto entre las muestras control y las tratadas con AIB. La única diferencia significativa observada fue un ligero descenso a lo largo del tiempo en las muestras tratadas con auxina, pero que no se corresponde en ningún momento con un efecto inductor o inhibidor debido a la propia auxina. Estas modificaciones pueden ser debidas a la manipulación de los explantos o a interacciones con otros factores. En la línea P2Rb, los niveles de expresión se mantuvieron constantes independientemente del tiempo y del tratamiento auxínico, sin diferencias significativas en ningún caso (Fig. 52 B). El tratamiento con NPA originó un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) de los niveles de expresión a las 24 con respecto a las muestras tratadas con AIB. En ningún caso existe interacción entre el tiempo y el tratamiento aplicado y el único factor que afecta a la expresión génica es la aplicación de NPA ( $P \leq 0,05$ ).

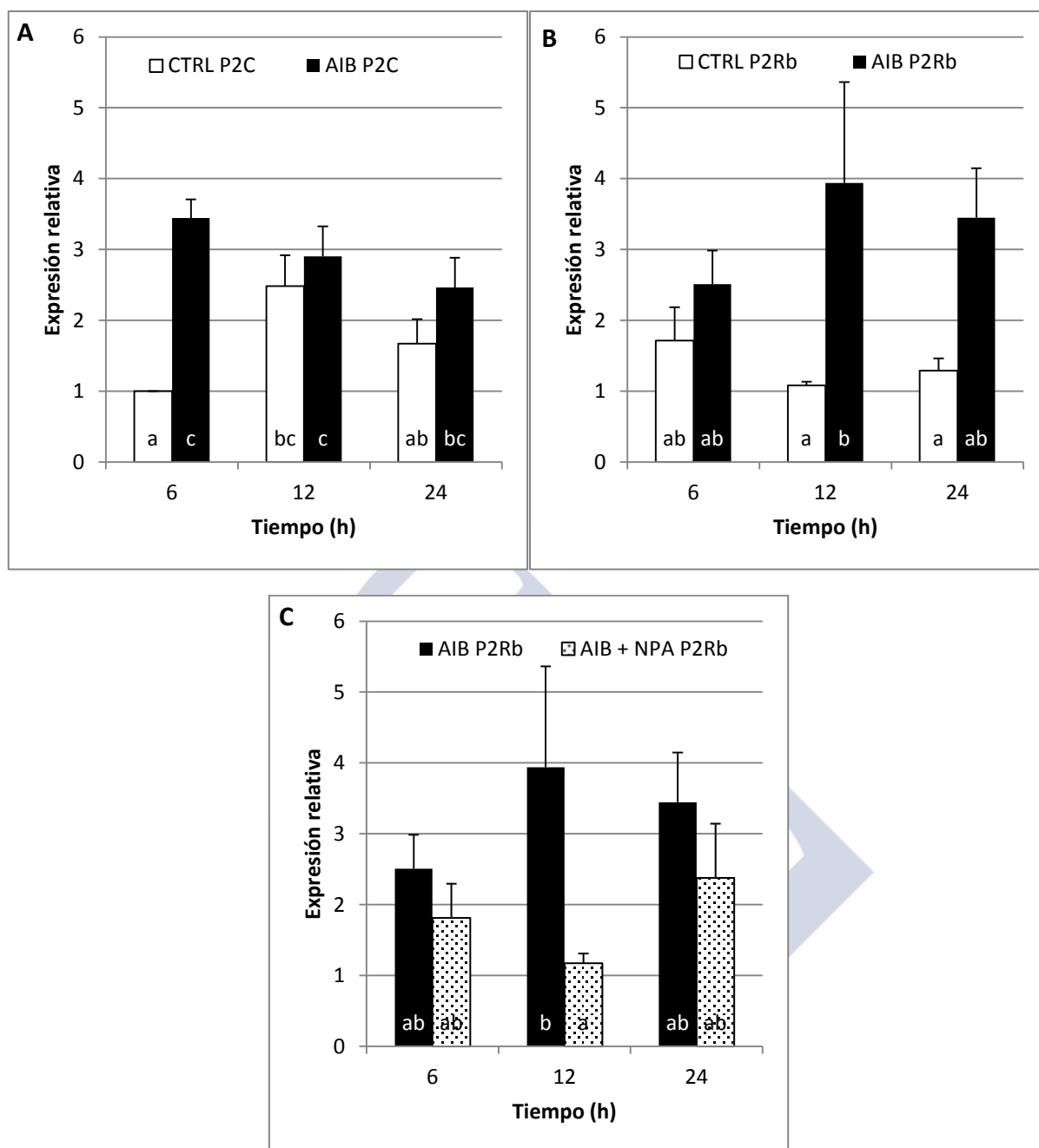
#### 4.2.5.3. *CsSHR2* (*Castanea sativa* *SHORT ROOT 2*)

En ambas líneas, juvenil y adulta, el patrón de expresión del gen *CsSHR2* se vio modificado por el tratamiento de auxina durante las primeras 24 horas, pero de forma diferente a lo largo del tiempo en cada una de las líneas como se muestra en la Figura 53 (A y B). En el caso del material adulto, se observó un incremento transitorio a las 12 horas de los niveles de expresión del gen en las muestras control. Por otra parte el tratamiento con auxina produjo un incremento significativo de los niveles del transcrito a las 6 horas, y los niveles se mantuvieron constantes durante las 24 horas analizadas (Fig. 53 A). Este patrón de expresión se debe a la interacción entre el tiempo y el tratamiento (Tabla 34). En la línea juvenil, las muestras control presentaron niveles constantes del transcrito durante las 24 horas analizadas. La expresión del gen *CsSHR2* se incrementó significativamente a las 12 horas tras el tratamiento con auxina con relación a su control (Fig. 53 B). La aplicación de NPA redujo significativamente la expresión del gen a las 12 horas, momento en el que los valores de expresión habían alcanzado los valores más altos con la inducción experimentada por la

aplicación de AIB (Fig. 53 C). La respuesta observada en la línea P2C se debe a la interacción entre ambos factores ( $P \leq 0,05$ ). Por el contrario en la línea P2Rb, no existe interacción y las diferencias observadas son debidas al tratamiento auxínico (Tabla 34). Estos resultados indican que el gen *CsSHR2* está regulado por auxina de forma diferencial C vs BS y sugieren que podría participar en la inducción del enraizamiento.



**Figura 52:** Niveles de expresión relativa del gen *CsSHR1* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño de brotes P2C (A) y de P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan.



**Figura 53:** Niveles de expresión relativa del gen *CsSHR2* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y de P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan. Los niveles de expresión (A) se deben a la interacción entre ambos factores ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 34:** Efecto del tiempo y del tratamiento con AIB y NPA en los niveles de expresión génica

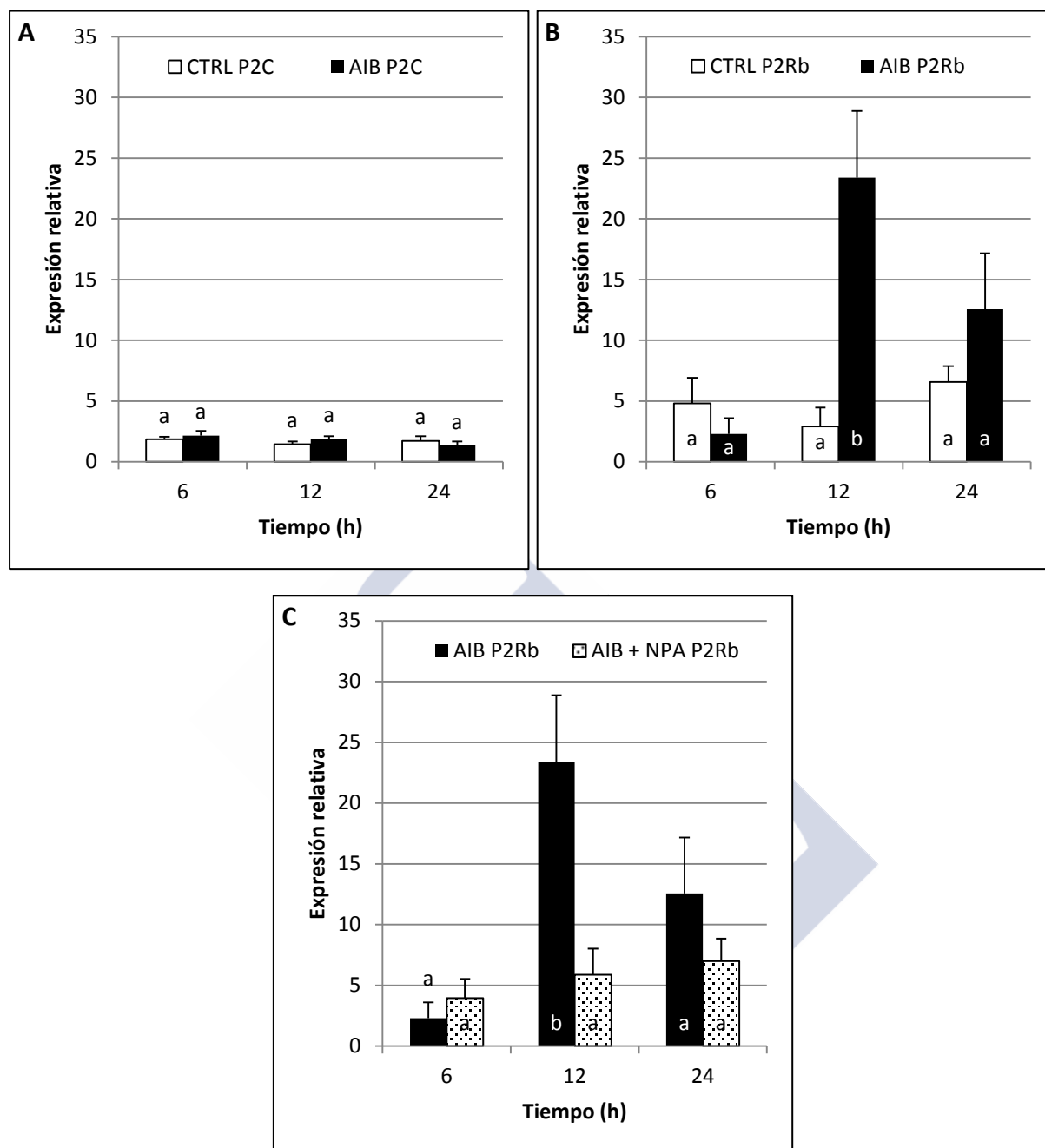
GEN	Fuente de variación	P2C (A) CTRL vs AIB				P2Rb (B) CTRL vs AIB				P2Rb (C) AIB vs NPA			
		g.l.	CM	F	Sig (5%)	g.l.	CM	F	Sig (5%)	g.l.	CM	F	Sig (5%)
<i>CsSCL3</i>	Tiempo	2	0.181	1.835	0.202	2	0.032	0.697	0.517	2	0.840	1.356	0.294
	Tratamiento	1	0.156	1.583	0.232	1	0.033	0.723	0.412	1	5.371	8.678	0.012
	Interacción	2	0.042	0.431	0.660	2	0.074	1.627	0.237	2	1.643	2.654	0.111
	Error	12	0.098			12	0.046			12	0.619		
<i>CsSHR1</i>	Tiempo	2	0.250	3.436	0.066	2	0.011	0.281	0.760	2	0.027	0.276	0.764
	Tratamiento	1	0.083	1.138	0.307	1	0.120	3.146	0.101	1	0.625	6.503	0.025
	Interacción	2	0.182	2.500	0.124	2	0.050	1.301	0.308	2	0.087	0.909	0.729
	Error	12	0.073			12	0.038			12	0.096		
<i>CsSHR2</i>	Tiempo	2	0.639	1.757	0.241	2	0.246	0.164	0.850	2	0.846	0.473	0.634
	Tratamiento	1	6.677	18.345	0.001	1	16.862	11.252	0.006	1	10.259	5.732	0.034
	Interacción	2	1.749	4.806	0.029	2	1.646	1.099	0.365	2	1.823	1.018	0.390
	Error	12	0.364			12	1.499			12	1.790		

#### 4.2.5.4. *CsENOD93* (*Castanea sativa* early nodulin 93)

El patrón de expresión del gen *CsENOD93* reveló que los niveles del transcrito en la línea adulta no experimentaron variaciones significativas durante las primeras 24 horas analizadas, ni por efecto de corte ni debido al tratamiento con AIB (Fig. 54 A). Por el contrario, en la línea P2Rb la aplicación de AIB indujo un pico de expresión transitorio a las 12 horas, alcanzando en este punto valores relativos de expresión superiores a 20 (Fig. 54 B). En las muestras control, los niveles de expresión se mantuvieron constantes durante las 24 horas analizadas. La aplicación del NPA a las muestras tratadas con auxina, inhibió significativamente la inducción del gen provocada por la auxina a las 12 horas (Fig. 54 C). Por lo tanto el gen *CsENOD93* se induce por auxina únicamente en el material juvenil, competente para enraizar, y esa inducción se bloquea al inhibir el TPA. A nivel estadístico (Tabla 35), las diferencias observadas en el material juvenil son debidas a la interacción entre el tiempo y el tratamiento ya sea con AIB o NPA ( $P \leq 0,05$ ).

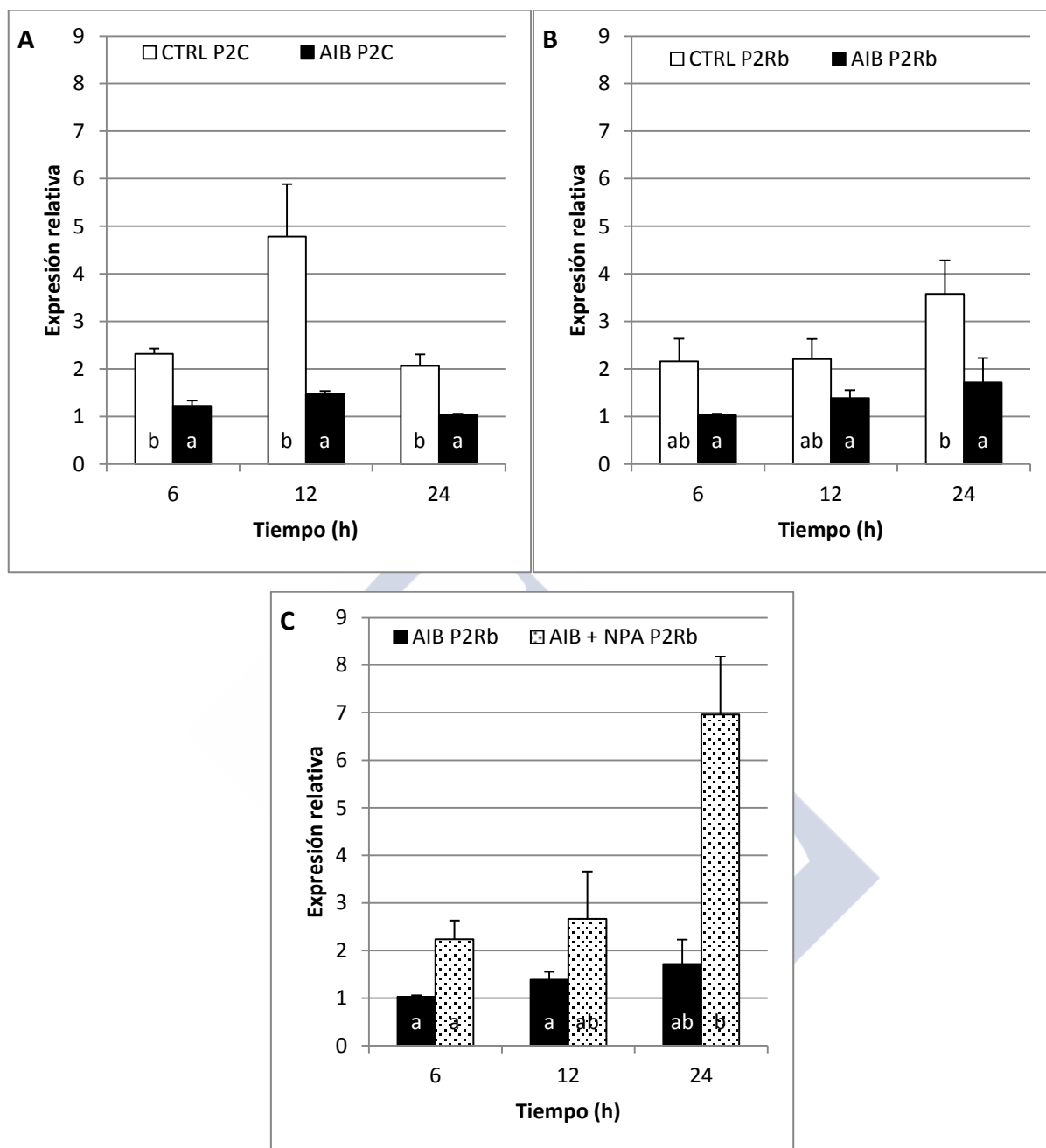
#### 4.2.5.5. *CsUGT* (*Castanea sativa* UDP-Glicosiltransferasa)

El gen *CsUGT* mostró un patrón de expresión bastante diferente a los descritos anteriormente (Fig. 55). En el material adulto, los niveles de expresión del gen disminuyeron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) tras la aplicación de auxina, en los tres tiempos analizados (Fig. 55 A). El material juvenil mostró también esa misma tendencia, pero solamente se encontraron diferencias significativas a las 24 horas, momento en que las muestras control alcanzan los valores máximos de expresión (Fig. 55 B). El tratamiento con NPA, no solo contrarrestó el efecto inhibitor en la expresión del tratamiento con AIB, sino que indujo significativamente la expresión génica a las 24 horas. Los valores relativos de expresión de las muestras tratadas simultáneamente con AIB y NPA a las 24 horas, prácticamente duplicaron a los valores más altos alcanzados por las muestras control, a las que no se sometió a ningún tipo de tratamiento hormonal. Estos resultados sugieren que la ruta de señalización auxínica está reprimiendo la expresión de dicho gen. Las diferencias observadas en el material adulto y en el juvenil al aplicar AIB y NPA (Fig. 55 A y C) se deben a la interacción entre ambos factores, el tiempo y el tratamiento hormonal para  $P \leq 0.05$  (Tabla 35).



**Figura 54:** Niveles de expresión relativa del gen *CsENOD93* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y de P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan. (B, C) Los niveles de expresión del material juvenil dependen de la interacción entre el tiempo y el tratamiento ( $P \leq 0,05$ ).





**Figura 55:** Niveles de expresión relativa del gen *CsUGT* durante la inducción del enraizamiento adventicio en hojas de castaño procedentes de brotes P2C (A) y de P2Rb (B, C) durante las primeras 24 horas tras los tratamientos con 25  $\mu$ M AIB, sin tratamiento hormonal (CTRL) y tratadas simultáneamente con 25  $\mu$ M AIB y 50  $\mu$ M NPA (AIB+NPA). Los valores muestran la media de tres replicados biológicos  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron normalizados usando tres genes referentes y se empleó como calibrador de cada replicado biológico la muestra con los niveles de expresión más bajos. Las diferentes letras marcan diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Duncan (B) y t de student. (A, C) Los niveles de expresión dependen de la interacción entre el tiempo y el tratamiento ( $P \leq 0,05$ ).

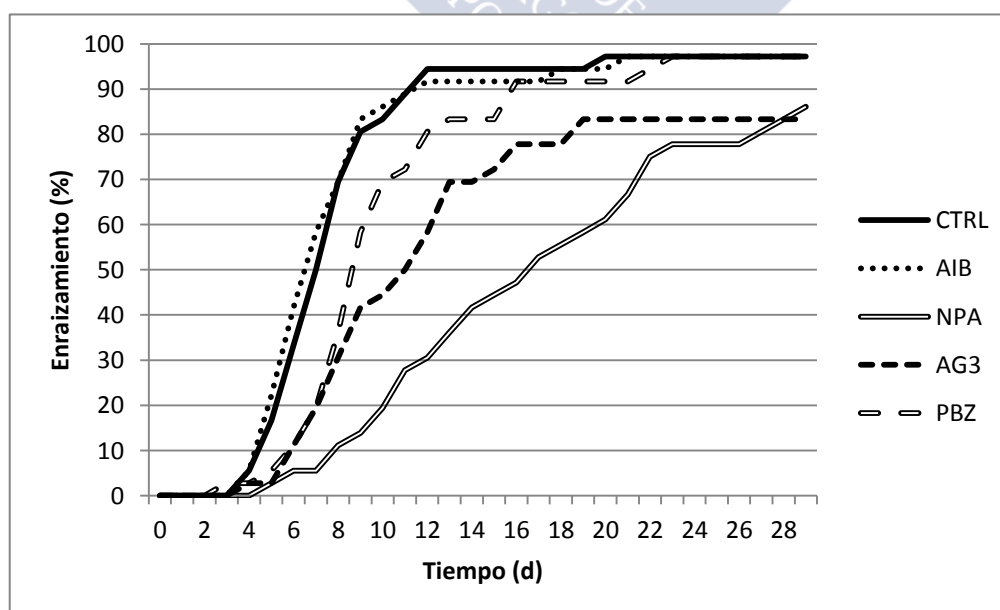
**Tabla 35:** Efecto del tiempo y del tratamiento con AIB y NPA en los niveles de expresión génica

GEN	Fuente de variación	P2C (A) CTRL vs AIB				P2Rb (B) CTRL vs AIB				P2Rb (C) AIB vs NPA			
		g.l.	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F
<i>CsENOD93</i>	Tiempo	2	0,338	1,272	0,316	141,352	4,629	0,032	200,249	6,353	0,013		
	Tratamiento	1	0,075	0,283	0,605	286,923	9,395	0,010	230,443	7,311	0,019		
	Interacción	2	0,278	1,046	0,381	202,639	6,635	0,011	140,727	4,465	0,036		
	Error	12	0,266			30,539			31,520				
<i>CsUGT</i>	Tiempo	2	4,380	6,722	0,011	1,871	3,118	0,081	12,796	8,739	0,005		
	Tratamiento	1	14,804	22,722	0,000	7,232	12,049	0,005	29,824	20,369	0,001		
	Interacción	2	2,529	3,881	0,050	0,433	0,722	0,506	8,008	5,469	0,020		
	Error	12	0,652			0,600			1,464				

**B. Populus****5. CAPACIDAD RIZOGÉNICA**

Empleando el chopo, como especie modelo, se evaluó el efecto de la manipulación hormonal de las rutas de señalización de las auxinas y las giberelinas en la respuesta rizogénica de los brotes cultivados *in vitro*. Para ello se realizaron 5 tratamientos: 2  $\mu$ M AIB, 5  $\mu$ M NPA, 2  $\mu$ M AG3 y 5  $\mu$ M PAC. Como controles se utilizaron brotes sin la aplicación de ningún tipo de regulador de crecimiento. No existen diferencias significativas en la respuesta entre las tres líneas evaluadas ni a nivel morfológico ni fisiológico. En la Figura 7, se muestran brotes al final del periodo de proliferación *in vitro* y en la Figura 8, se muestran las tres líneas aclimatadas *ex vitro*, confirman que no hay diferencias fenotípicas entre ellas.

El chopo es una especie con elevada capacidad rizogénica (Fig. 56), que no necesita de ningún tratamiento hormonal para que se produzca el EA *in vitro*. En el tratamiento control, se alcanzó el 97 % de enraizamiento y la emergencia de las RAs tuvo lugar aproximadamente a los 9 días (Tabla 36). Los tratamientos con AIB y PAC no mejoraron la respuesta rizogénica de los brotes en términos de porcentaje de enraizamiento y tiempo requerido para la emergencia de las raíces. Por el contrario tanto la aplicación de AG3 como la de NPA redujeron ligeramente el porcentaje de enraizamiento (significativamente en el caso del AG3) y además el NPA provocó un retraso significativo del enraizamiento de 8 días (Tabla 36; Fig. 56).



**Figura 56:** Efecto del tratamiento hormonal en la cinética del enraizamiento de brotes de chopo. Los brotes fueron cultivados en medio MS $\frac{1}{2}$  y tratados con AIB (2  $\mu$ M), NPA (5  $\mu$ M), AG3 (2 $\mu$ M), PAC 5 ( $\mu$ M) o sin reguladores de crecimiento (CTRL).



**Figura 57:** Brotes de chopo de la línea SHR1PGG1A enraizados *in vitro* en medio MS½ a los 30 días tras el tratamiento hormonal. De izquierda a derecha se muestran brotes sin tratamiento hormonal (CTRL); tratado con AIB (2  $\mu$ M), con NPA (5  $\mu$ M), con AG3 (2  $\mu$ M) y con PAC (5  $\mu$ M).

Como podemos observar en la Tabla 36, el número de RAs desarrolladas fue el parámetro más afectado por los diferentes tratamientos. La aplicación de AIB no afectó significativamente al número de raíces, aunque en general este es ligeramente menor al de las muestras control. El tratamiento con PAC, incrementó significativamente el número de raíces con respecto a cualquiera de los otros tratamientos, alcanzando el valor máximo (15,9 raíces). De nuevo, el NPA y el AG3 afectaron negativamente a la capacidad rizogénica de los brotes, reduciendo el número de raíces a 2,7 y 4,5, respectivamente, frente a 11,1 raíces formadas en el tratamiento control. Independientemente del tratamiento aplicado, en general las raíces se desarrollaron en un único punto en la base del tallo. Como se muestra en la Figura 57, la RAs emergieron formando una roseta alrededor del tallo, excepto en los brotes tratados con NPA, en los que frecuentemente las pocas raíces desarrolladas emergían a partir de una zona localizada en una de las mitades de la zona basal del tallo. La longitud de las raíces se vio reducida significativamente al aplicar NPA y PAC, con respecto a los otros tratamientos en los que la longitud se mantuvo constante. Además, la formación de RLs se redujo al aplicar NPA y PAC, siendo este efecto más acusado y significativo en el tratamiento con PAC, ya que en aquellos brotes que formaron RLs, estas fueron escasas y muy cortas, (escasamente 1 mm), como se muestra en la figura 57.

Finalmente evaluamos el estrés de los brotes en respuesta a los diferentes tratamientos, en términos de necrosis apical y capacidad de reemprender el crecimiento. En general, independientemente del tratamiento no mostraron síntomas significativos de estrés. La presencia de necrosis apical fue ocasional, posiblemente debida a la manipulación de los brotes más que al tratamiento aplicado. En el chopo, especie de crecimiento rápido, que no lo detiene durante la fase de EA, se observó que la aplicación de NPA y PAC bloqueó el crecimiento de los brotes aunque siguen mostrando un aspecto vigoroso, especialmente en los brotes tratados con PAC.

**Tabla 36:** Efecto del tratamiento hormonal en la respuesta rizogénica y fisiológica de los brotes de chopo.

Tratamiento hormonal	Enraizamiento (%)	Emergencia (d)	N° raíces	Longitud (mm)	Raíces laterales (%)	Necrosis (%)	RC (mm)
CTRL	97,2 ± 2,8 a	8,8 ± 0,7 a	11,1 ± 0,6 c	31,8 ± 1,3 a	94,2 ± 2,9 a	0,0 ± 0,0 a	20,8 ± 2,3 a
AIB (2 µM)	97,2 ± 2,8 a	8,8 ± 1,0 a	7,9 ± 0,7 c	30,0 ± 2,0 a	97,2 ± 2,8 a	5,5 ± 2,8 a	25,0 ± 1,7 a
NPA (5 µM)	86,1 ± 2,8 ab	16,9 ± 1,3 b	2,7 ± 0,7 a	20,8 ± 3,4 b	80,0 ± 10,0 a	0,0 ± 0,0 a	4,2 ± 0,6 c
AG3 (2 µM)	83,3 ± 4,8 b	11,5 ± 0,5 a	4,5 ± 0,3 b	28,1 ± 1,2 a	93,9 ± 6,1 a	0,0 ± 0,0 a	11,0 ± 2,7 b
PAC (5 µM)	97,2 ± 2,8 a	11,1 ± 0,6 a	15,9 ± 0,5 d	20,1 ± 1,2 b	62,9 ± 2,4 a	0,0 ± 0,0 a	2,6 ± 0,1 c

Los datos representan valores medios ± error estándar de tres replicados biológicos con 12 explantos cada uno. Las diferentes letras, en cada parámetro, representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

En la Tabla 37 se comparó la respuesta fisiológica de las tres líneas de cultivo, mostrando que no existen diferencias significativas ( $P \leq 0,01$ ) en ninguno de los parámetros evaluados entre las líneas transgénicas y la línea wild type.

En general observamos que no es necesaria la aplicación de auxinas exógenas para obtener una buena respuesta rizogénica y su aplicación no mejoró la capacidad de

enraizamiento, sin embargo la aplicación de NPA, al bloquear el TPA endógenas causó un retraso del enraizamiento y redujo el número y la longitud de las raíces. Por otro lado el AG3 afectó negativamente a la capacidad rizogénica, reduciendo el porcentaje y el número de RAs y la aplicación de PAC incrementó el número de raíces desarrolladas.

**Tabla 37:** Análisis de la varianza de la interacción entre el tratamiento y el clon. Se estableció diferencias significativas para  $P \leq 0,001$ .

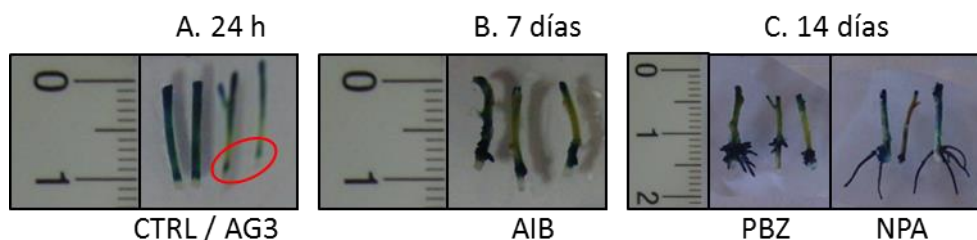
Fuente de variación	g.l.	Enraizamiento (%)			Emergencia (d)			N° Raíces		
		CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)
Tratamiento	4	513,467	5,407	0,007	78,086	29,194	0,000	159,135	134,458	0,000
Clon	2	87,498	0,921	0,419	0,156	0,058	0,944	2,428	2,051	0,163
Interacción	8	23,679	0,249	0,973	2,951	1,103	0,413	1,587	1,341	0,297
Error	15	94,972			2,675			1,184		
Fuente de variación	g.l.	Longitud (mm)			Raíces laterales (%)			Necrosis (%)		
		CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)
Tratamiento	4	185,203	6,286	0,004	1215,784	10,043	0,000	35,995	1,333	0,303
Clon	2	108,144	3,670	0,050	232,487	1,920	0,181	0,000	0,000	1,000
Interacción	8	28,278	0,960	0,500	123,919	1,024	0,460	22,497	0,833	0,588
Error	15	29,465			121,063			26,996		
Fuente de variación	g.l.	RC (mm)			El análisis se llevó a cabo con dos replicados biológicos con 12 explantos cada uno.					
		CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)	CM	F	Sig (5%)
Tratamiento	4	404,512	36,426	0,000						
Clon	2	3,860	0,348	0,712						
Interacción	8	14,623	1,317	0,307						
Error	15	11,105								



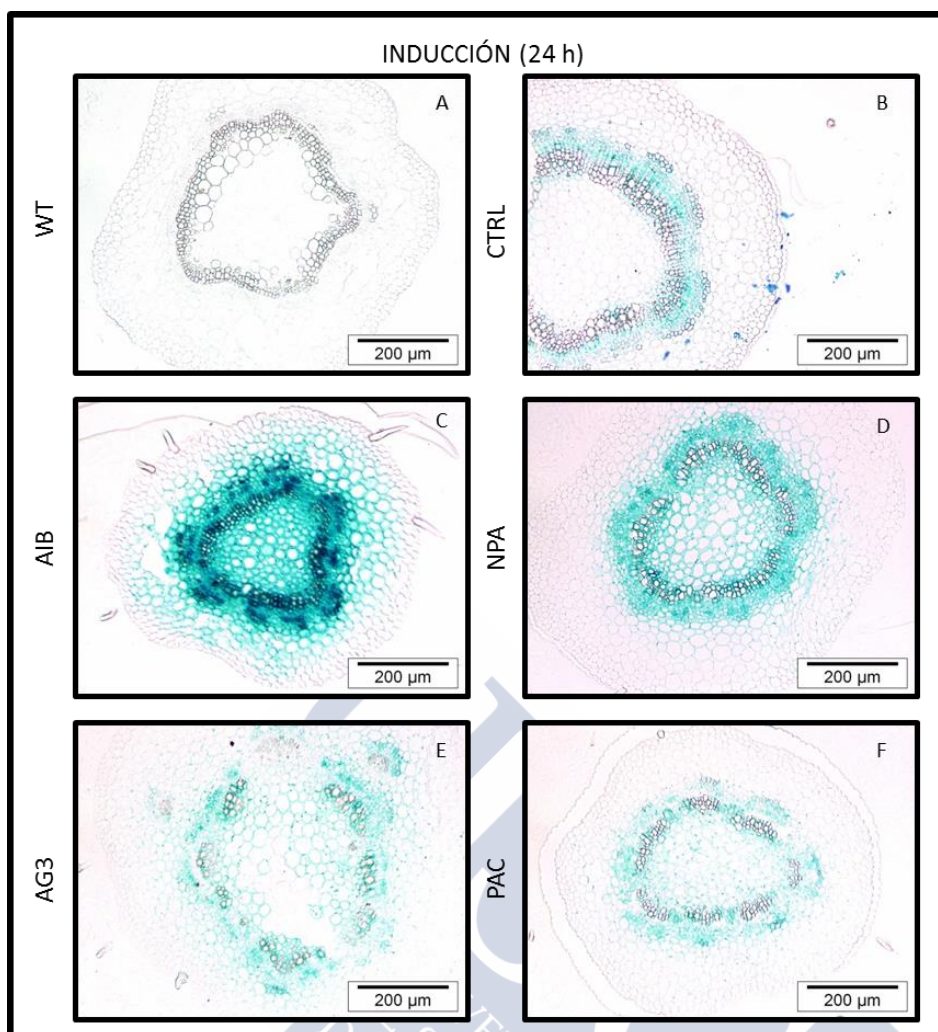
## 6. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *pPtSHR1::GUS*

Con el fin de evaluar la regulación del gen *PtSHR1* por las vías de señalización hormonal de auxinas y del ácido giberélico, se recogió la zona basal de los brotes de la línea transgénica *SHR1PGG1A*, que lleva la construcción *pPtSHR1::GUS*, tratados con AIB, NPA, AG3 y PAC a diferentes tiempos (24 horas, 7 días y 14 días) tras el inicio de estos tratamientos. Además, se recogieron muestras control, sin tratamiento hormonal así como muestras del fenotipo salvaje, no portadoras de la construcción *pPtSHR1::GUS* y por lo tanto sin actividad GUS en el análisis histoquímico.

En los brotes de chopo, al igual que ocurre en *Arabidopsis*, la respuesta rizogénica está muy focalizada en un punto de la zona basal, 1-2 mm por encima del corte. En ese punto tienen lugar cambios moleculares directamente asociados con el EA, como se observa en la Figura 58. El análisis histoquímico de las muestras procedentes de las líneas transgénicas recogidas a las 24 h, mostró que el patrón de localización GUS se vio alterado por los diferentes tratamientos hormonales (Fig. 59). Como era esperable, en las muestras procedentes del fenotipo salvaje, no se detectó actividad GUS (Fig. 59 A). En las muestras de la línea transgénica sin tratamiento hormonal (Fig. 59 B) la expresión se localizó específicamente en el haz vascular, tanto en el xilema como en el floema y el cambium. Los tratamientos con AIB y con NPA produjeron un incremento de la actividad GUS controlada por el promotor *PtSHR1*, siendo la señal bastante más intensa en el tratamiento con AIB (Fig. 59 C, D) y en ambos casos se expandió hacia el córtex y la medula. La alteración de la ruta de señalización de las giberelinas, mediante la aplicación de AG3 y PAC, también modificó el patrón de expresión génica. Estos tratamientos produjeron una disminución de la señal de GUS, siendo menos intensa y más difusa a lo largo del cilindro vascular y la medula que en las muestras control (Fig. 59 E y F).



**Figura 58:** Determinación histoquímica de la actividad GUS en la zona basal de brotes de la línea transgénica portadora de la construcción *pPtSHR1::GUS*, tras los tratamientos control, AG3, AIB, PAC y NPA, recogidos a diferentes tiempos



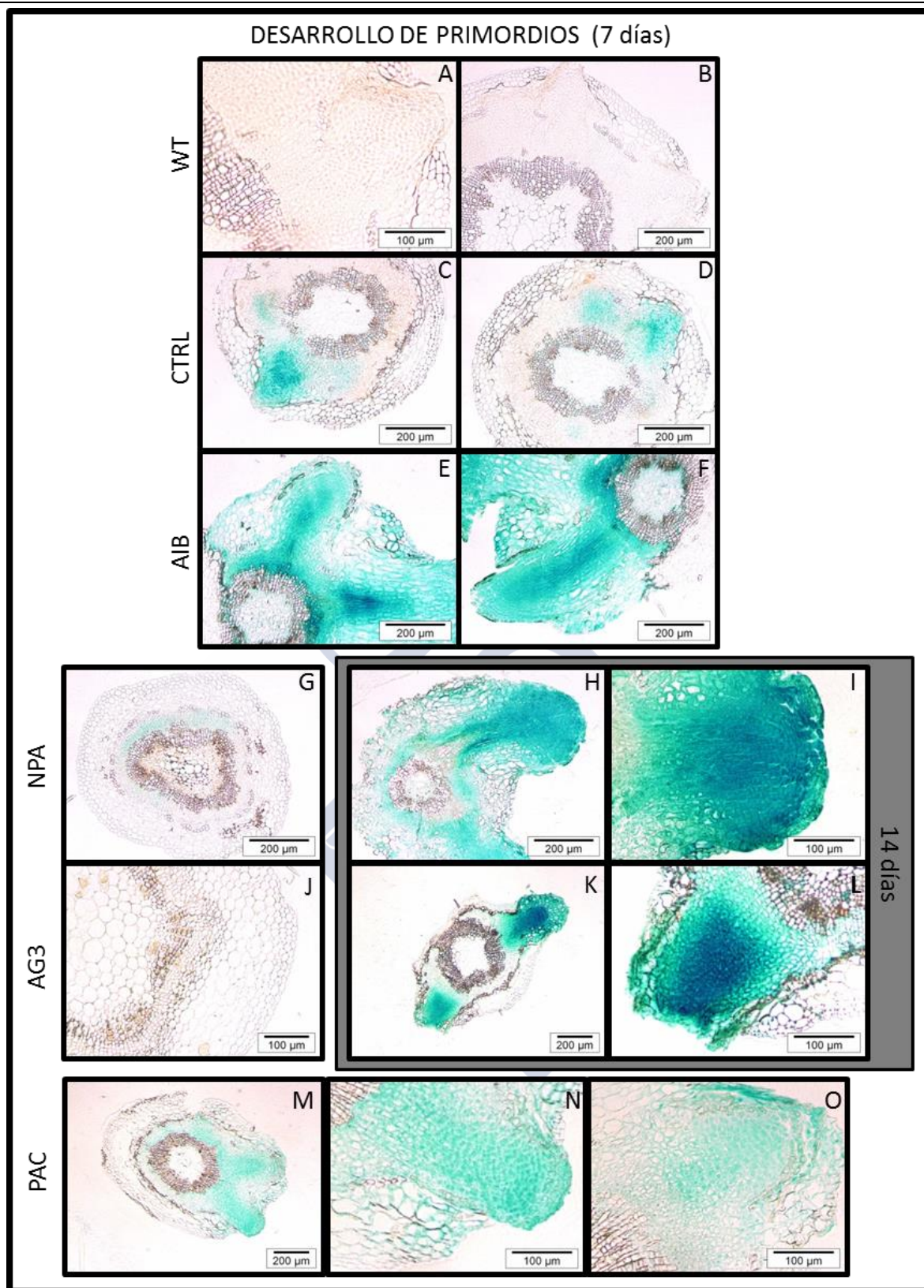
**Figura 59:** Patrón de expresión del gen reportero GUS en brotes de chopo con fenotipo salvaje (A), y de la línea transgénica portadora de la construcción *pPrSHR1::GUS* (B, C, D, E, F). Secciones transversales de la zona basal de brotes recogidos a las 24 h sin tratamiento hormonal (A, B) y de brotes tratados con AIB 2  $\mu$ M (C); con NPA 5  $\mu$ M (D); con AG3 2  $\mu$ M (E) y con PAC 5  $\mu$ M (F). La expresión se determinó mediante tinción histoquímica de la actividad GUS.

Para analizar la regulación del gen *PtSHR1* durante el desarrollo de los primordios de RAs bajo los diferentes tratamientos hormonales se recogieron muestras a los 7 y 14 días, ya que como se indicó en el apartado anterior dependiendo del tratamiento la emergencia de las raíces tuvo lugar entre los 8 y 17 días. Como se observa en la Figura 60, con todos los tratamientos se produjo EA, sin embargo el patrón de expresión temporal y espacial del gen marcador GUS fue diferente según el tratamiento. El patrón radial de crecimiento del primordio también se vio alterado, en función del tratamiento aplicado. En las plantas no transgénicas, y sin ningún tratamiento, se observaron primordios desarrollados a los 7 días, pero como era esperable no se detectó ninguna coloración azul tras realizar la tinción histoquímica (Fig. 60 A y B). En las plantas transgénicas control, a los 7 días la presencia de primordios fue también evidente, con una localización específica de la actividad GUS en

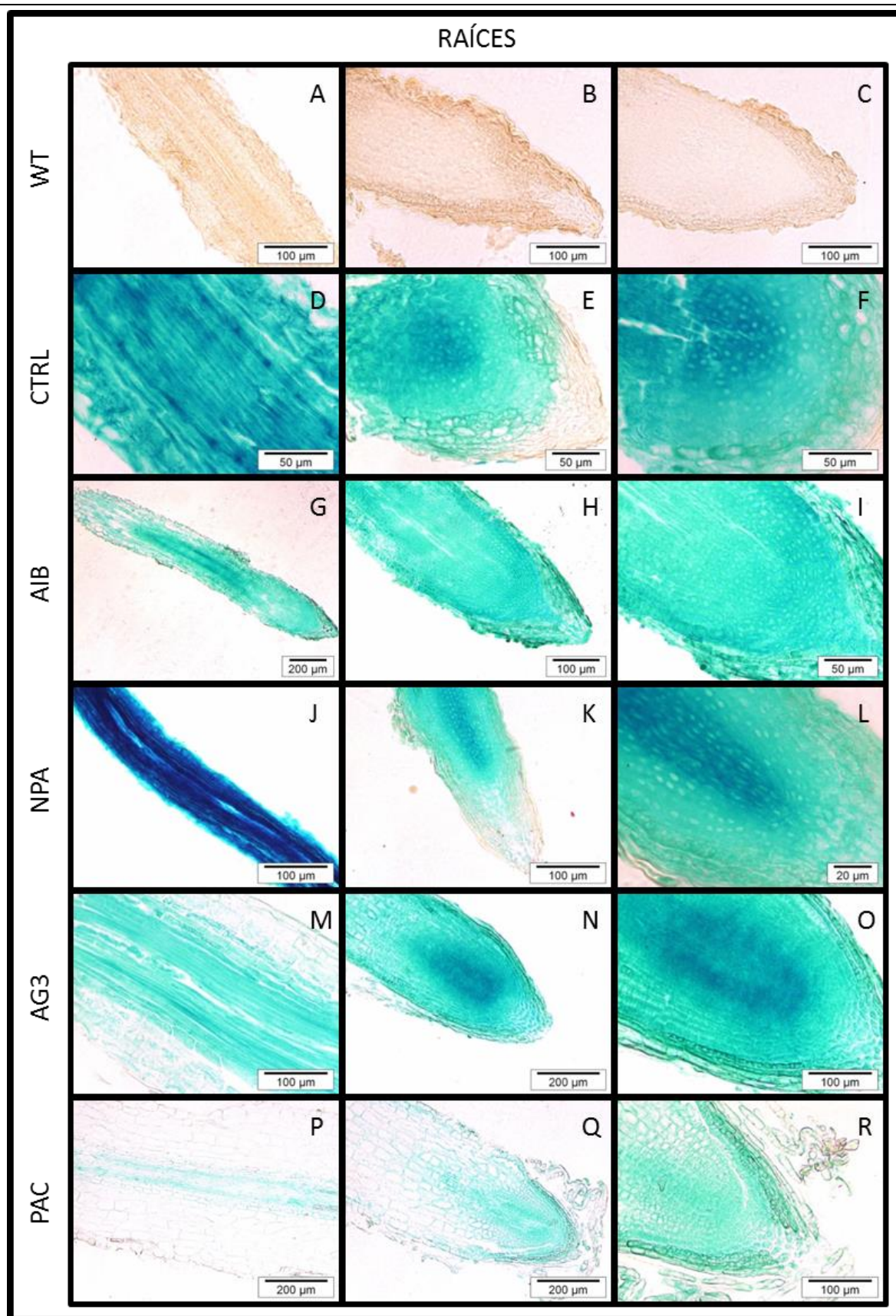
dichos primordios desde sus primeras etapas del desarrollo hasta su emergencia (Fig. 60 C y D). La aplicación de AIB incrementó la actividad GUS con una señal muy patente en el cambium y floema del brote y en todo el primordio, especialmente en los haces que conectan el cilindro vascular del brote y de la RA emergente, y leve y difusa en el resto de tejidos del brote. (Fig. 60 E y F). En los brotes transgénicos tratados con NPA, a los 7 días no se observó la presencia de primordios (Fig. 60 G), momento en que se detectó una leve actividad GUS muy focalizada en el floema, en los cortes que corresponden a la zona concreta donde tiene lugar la respuesta rizogénica (1-2 mm por encima de la zona de corte), como se mostró en la Figura 58. A los 14 días tras el tratamiento con NPA (Fig. 60 H e I), sí se observó la presencia de primordios desarrollados, en los cuales la tinción GUS mostró un patrón ligeramente distinto al observado en las muestras tratadas con AIB. La expresión no se focalizó exclusivamente en los primordios, también se detectó de forma leve y difusa en todos los tejidos del brote y de forma algo más intensa en las capas externas del floema. La capa de córtex perdió la organización del tejido sin llegar a generar un callo aparente a nivel macroscópico. Por el contrario en el primordio la expresión fue muy patente, especialmente en el meristemo central, y prácticamente ausente en la inserción del brote y la RA. Como se muestra en la Figura 60 I, en una imagen de más aumentos del meristemo apical del primordio, las células no presentaron una disposición tan ordenada y organizada en capas concéntricas como en los primordios desarrollados en las muestras control y las tratadas con AIB, de forma que el tratamiento con NPA alteró el patrón radial característico del ápice radicular. De nuevo el efecto del tratamiento con AG3 mostró similitudes con el de NPA (Fig. 60 J, K y L). A los 7 días (Fig. 60 J), no se observó la formación de primordios ni se detectó ningún tipo de señal debido a la actividad GUS. A los desarrollados, mucho más intensa en el meristemo central, el cual ha perdido la organización radial celular, y sin muestras de actividad GUS en los tejidos del brote. Finalmente se evaluaron muestras tratadas con PAC y recogidas a los 7 días (Fig. 60 M, N y O) en las cuales la señal fue más tenue y se focalizó en los primordios de RAs.

También se analizó el patrón de expresión en las RAs desarrolladas con cada uno de los tratamientos hormonales. Como se muestra en la Figura 61 la actividad GUS fue intensa en el ápice de la raíz en todos los tratamientos, pero con un patrón de distribución específico en cada uno de ellos. En primer lugar se muestran secciones de raíces del fenotipo salvaje, en las cuales no se detectó expresión GUS ya que no contiene la construcción *pPtSHR1::GUS* (Fig. 61 A, B y C ).





**Figura 60:** Patrón de expresión del gen reportero GUS en brotes de chopo con fenotipo salvaje (A, B), y de la línea transgénica portadora de la construcción *pPtSHR1::GUS* (de la C a la O). Secciones transversales de la zona basal de brotes recogidos a los 7 d sin tratamiento hormonal (C, D) y tratados con AIB 2  $\mu$ M (E, F); con NPA 5  $\mu$ M (G); con AG3 2  $\mu$ M (J) y con PAC 5  $\mu$ M (M, N, O) y recogidos a los 14 d, tratados con NPA 5  $\mu$ M (H, I) y con AG3 2  $\mu$ M (K, L). La expresión se determinó mediante tinción histoquímica de la actividad GUS. 14 días tras el tratamiento, se pueden observar la expresión GUS focalizada en los primordios



**Figura 61:** Patrón de expresión del gen reportero GUS en brotes de chopo con fenotipo salvaje (A, B, C), y de la línea transgénica portadora de la construcción *pPtSHR1::GUS* (de la D a la R). Secciones longitudinales de raíces crecidas sin tratamiento hormonal (D, E, F) y tratados con AIB 2  $\mu$ M (G, H, I); con NPA 5  $\mu$ M (J, K, L); con AG3 2  $\mu$ M (M, N, O) y con PAC 5  $\mu$ M (P, Q, R). La expresión se determinó mediante tinción histoquímica de la actividad GUS.



En las raíces de la línea transgénica desarrolladas en medio sin reguladores de crecimiento, la expresión se detectó a lo largo de toda la raíz y en todos los tejidos a excepción de en la caliptra. En estas raíces la coloración azul fue más intensa en la endodermis de la zona media de la raíz y en el meristemo central del ápice (Fig. 61 D, E y F). En las raíces desarrolladas en un medio que contiene AIB, la expresión fue uniforme en todos los tejidos a excepción de en la endodermis, donde la coloración azul fue más intensa (Fig. 61 G, H e I). La aplicación de NPA incrementó considerablemente la actividad GUS en todos los tejidos de la zona media de la raíz y en el meristemo central del ápice radicular. Por otra parte, no se detectó expresión GUS en la caliptra. En medio con NPA se desarrollaron raíces muy estrechas y con un ápice deforme (Fig. 61 J, K y L). En las raíces desarrolladas en AG3, la actividad del promotor en la zona media de la raíz se localizó en la estela y de forma más intensa en la endodermis, que aparentemente presentó más de una capa celular, mientras que su actividad fue muy baja en las células del córtex. Las raíces desarrolladas en presencia de AG3 mostraron un mayor desarrollo del cilindro vascular frente a un córtex con pocas capas celulares. El ápice mostró sobreexpresión en el procambium y debido a ella, desorganización celular (Fig. 61 M, N y O). Finalmente, el PAC redujo los niveles de actividad GUS en la zona media de la raíz, con una expresión baja y focalizada en la endodermis y en las células con actividad meristemática del ápice radicular (Fig. 61 P, Q y R). Las raíces desarrolladas en PAC, mostraron una reducción del meristemo apical de la raíz en comparación con las raíces desarrolladas sin reguladores de crecimiento (CTRL). Bajo este tratamiento se desarrollaron raíces gruesas con un cilindro vascular muy estrecho y un incremento de las capas de células del córtex (Fig. 61 P).



# Discusión





## A. CASTANEA SATIVA

### 1. RESPUESTA RIZOGÉNICA A LA APLICACIÓN DE AUXINAS

El EA es una etapa crucial en la propagación vegetativa de árboles y plantas hortícolas y ornamentales de interés agronómica, forestal e industrial. Sin embargo, sigue siendo una de las principales limitaciones en la propagación clonal de árboles adultos seleccionados, especialmente en el caso de especies recalcitrantes como es el castaño, especie utilizada a lo largo de esta memoria. La formación de RAs, es imprescindible para la obtención de plantas funcionales, tanto en procesos de estaquillado como en sistemas de micropropagación a partir de brotes cultivados *in vitro*. Por ello, hoy en día se sigue investigando en la optimización de las condiciones de enraizamiento para diversas especies forestales de interés industrial. Por ejemplo en *Cornus mas*, el porcentaje máximo de enraizamiento alcanzado fue del 73% (Đurković y Bukovská, 2009), y esta eficiencia fue aún menor en *Beilschmiedia berterooan*, especie amenazada endémica de Chile, en la que el porcentaje máximo de brotes enraizados no alcanzó el 50% (Uribe *et al.*, 2011). La principal dificultad viene dada por la cantidad de factores endógenos y exógenos que regulan el proceso como el  $\text{Ca}^{2+}$ , los azúcares, las auxinas, las poliaminas, el etileno, el óxido nítrico, el peróxido de hidrogeno, el monóxido de carbono, cGMP, MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) y las peroxidasas, entre otros (Geiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Bellini *et al.*, 2014). Esto datos reflejan la tremenda dificultad que supone la optimización de protocolos y las grandes diferencias en la capacidad rizogénica y los requerimiento de cada especie. El conocimiento en profundidad del EA, las bases moleculares que lo dirigen y sus rutas de control y regulación nos permitirá establecer nuevas vías de optimización del proceso.

En especies de difícil enraizamiento, como es el caso del castaño, la aplicación de auxina exógena es un requisito necesario para inducir la formación de RAs, al igual que en *Mesembryantemun crystallinum* L. (Konieczny *et al.*, 2009), *Aloe vera* (Lee *et al.*, 2011), *Juglans regia* (Heloir *et al.*, 1996), *Malus domestica* (Naija *et al.*, 2008) y otras especies de la familia fagaceae como *Quercus suber* (Manzanera y Pardos, 1990) y *Q robur* (Sánchez *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2003). En castaño, desde hace años en nuestro laboratorio se han establecido protocolos para el enraizamiento *in vitro* de diferentes clones (Sánchez *et al.*, 1997b; Viéitez *et al.*, 1986, 1989, 2007), ajustando los tratamientos en función del genotipo y

las características (juveniles o adultas) del material. En este trabajo hemos profundizado en diferentes aspectos del EA de castaño, utilizando para ello dos líneas (juvenil y adulta) del mismo clon y que han servido como sistema experimental en las dos últimas décadas. En primer lugar, hemos comprobado, que utilizando el mismo tratamiento, los porcentajes de enraizamiento de los brotes coinciden plenamente con los obtenidos en este mismo clon poco después de su establecimiento *in vitro* hace más de 20 años (Sánchez y Viéitez, 1991), lo que pone de manifiesto la estabilidad de estos brotes en cuanto a su capacidad de enraizamiento. Por otra parte, ambos tratamientos ensayados (“dipping” y AIB 75  $\mu$ M) resultaron eficientes para la inducción de raíces, con altos porcentajes de enraizamiento, tiempo similar en la emergencia de raíces y en la longitud de las mismas. Tratamientos similares, variando la concentración (125  $\mu$ M) y tiempo de aplicación (24-48 h) de AIB, ya habían sido descritos no solo en castaño (Sánchez *et al.*, 1997b) sino también en otras fagáceas, como *Quercus robur* (Sánchez *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2003) o en *Q. alba*, *Q. bicolor* y *Q. rubra* (Viéitez *et al.*, 2009).

El estrés generado por el proceso de enraizamiento fue evidente en los brotes, independientemente del tratamiento utilizado, sin embargo se acusó de forma diferente en cada uno de ellos. Así, en el caso de “dipping” se manifestó en una pérdida de turgencia general del brote, la cual puede estar asociada con el posible incremento de la síntesis de etileno producido por concentraciones elevadas de auxina (de Klerk *et al.*, 1999). Por otra parte, en los brotes enraizados con dosis más bajas de auxina, el estrés afectó únicamente al ápice, ya que mostraron un aspecto vigoroso pero altos porcentajes de sequía o necrosis apical, que en algunos casos son capaces de contrarrestar mediante el reemprendimiento del crecimiento de yemas axilares, y que finalmente no afectan a su viabilidad. La presencia de necrosis parece ser causada por una deficiencia en citoquininas y otros nutrientes como el calcio, ya que los brotes pasan de estar en un medio de proliferación que contiene BA a un medio de enraizamiento con los macronutrientes reducidos a  $\frac{1}{3}$  y desprovisto de citoquininas (Piagnani *et al.*, 1996). Otra posible hipótesis es que al inducir el enraizamiento se retira el callo basal que pudiera actuar como un reservorio de nutrientes y citoquininas, y por lo tanto se puede generar un déficit en nutrientes y reguladores de crecimiento, retrasando su distribución eficiente en la planta (Viéitez *et al.*, 1989). Estos autores consiguieron paliar la necrosis apical mediante la eliminación del ápice y la aplicación local de BA en esa zona para inducir el crecimiento de las yemas axilares. Otra posible alternativa para prevenir dicha necrosis, es la aplicación de bajas concentraciones de citoquinina en el medio de

enraizamiento, aunque con ello normalmente se inhibe la respuesta rizogénica (Xing *et al.*, 1997).

Cabe destacar, que el tipo de tratamiento auxínico afectó al patrón de desarrollo radicular, tanto en el número de raíces como en su distribución. En base a estos parámetros y dependiendo de la utilidad del sistema, el mayor número de raíces obtenido mediante “dipping” y su distribución, no solo en la zona basal sino también a lo largo del tallo, pudiera ser favorable para la posterior supervivencia de los brotes una vez transferidos a condiciones *ex vitro*. Este patrón de desarrollo radicular acrobasal también se ha observado en otras especies como *Prunus* con tratamientos similares de AIB, pero no en los tratamientos con AIA (Štefančič *et al.*, 2005). Sin embargo, tampoco puede atribuirse únicamente al tipo de auxina o tipo de tratamiento, “dipping” o inclusión en el medio, ya que en el caso de *Cornus mas* las raíces también emergieron de las partes aéreas tras el tratamiento con ANA incluida en el medio pero no con el de AIB (Đurkovič y Bukovská, 2009). En general, ambos tratamientos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, puede resultar funcional a nivel práctico para la obtención de plantas enraizadas. En el caso del castaño, una de las ventajas del tratamiento de “dipping”, es que puede realizarse *ex vitro*, procediendo directamente a la aclimatación de la planta, lo cual redundaría en una reducción de costes y mano de obra. De hecho, esta metodología está siendo utilizada para la producción de planta en la empresa Tragsa y también en nuestro laboratorio (Vidal *et al.*, 2015). Sin embargo, a la hora de llevar a cabo otros estudios a nivel bioquímico o molecular, lo ideal es que dicha respuesta se concentre en un único punto especialmente durante las primeras etapas en que no se evidencian cambios morfológicos.

En este trabajo, con la finalidad de estudiar y conocer los mecanismos moleculares que regulan el proceso de enraizamiento en castaño, hemos desarrollado un sistema experimental simple y alternativo al descrito en brotes, utilizando hojas procedentes de los brotes cultivados *in vitro*. Los resultados obtenidos en el sistema de hojas de castaño, ponen de manifiesto que las hojas enteras son más apropiadas que los segmentos de hojas para nuestros estudios, tanto por el porcentaje de enraizamiento como por el número de raíces desarrolladas por explanto. Por otra parte, se corrobora la utilidad del sistema de hojas para estudiar el EA en castaño, ya que muestra una respuesta rizogénica muy similar al de los brotes, tanto en porcentaje de enraizamiento como en el tiempo requerido para la emergencia de las raíces. En otros trabajos se ha mostrado que la capacidad rizogénica de las hojas puede ser incluso mayor que la de otros órganos, tales como hipocótilos, como ocurre en el caso de las hojas de *Chicorium intybus* L cv Focus (Nandagopal y Kumari, 2007) o mayor que los tallos en el caso de

*Plumbago zeylanica* L. y *Labisia pumila* var. *Alata* (Sivanesan y Jeong, 2009; Ling *et al.*, 2013). Como ya ocurría en el sistema de brotes, el proceso de enraizamiento en hojas es bastante sincrónico, lo que facilita la evaluación de pequeños cambios moleculares que tienen lugar en períodos muy cortos de tiempo durante el proceso de enraizamiento. Aunque el número de raíces desarrollado en hojas es menor que en los brotes de castaño tratados mediante “dipping”, el hecho de que en las hojas la mayoría de las raíces se originan en la zona basal del peciolo, supone una ventaja con relación al sistema de brotes, ya que de esta manera se focaliza la respuesta rizogénica lo que facilita tanto el estudio anatómico durante la inducción del enraizamiento, como la evaluación de factores bioquímicos y moleculares que tienen lugar durante el proceso de enraizamiento.

En otras especies también se han utilizado diversos tipos de explantos para evaluar diferentes aspectos del proceso. Falasca *et al.* (2004) establecieron las condiciones óptimas de enraizamiento mediante “thin cell layers” (capas delgadas de células seccionadas del tallo) para estudiar los factores genéticos y bioquímicos que controlan el EA en *Arabidopsis thaliana*. También en *Arabidopsis*, Correa *et al.* (2012) desarrollaron un sistema en cultivos hidropónicos de hojas para evaluar los cambios que tienen lugar en la actividad peroxidasa y en el contenido en compuestos fenólicos y azúcares durante el proceso de enraizamiento en presencia o ausencia de auxina exógena. Más recientemente, el sistema de hojas de *Arabidopsis* se utilizó para investigar el efecto de las hormonas endógenas y los mecanismos moleculares implicados en la formación de RAs, sin la aplicación de auxina exógena (Chen *et al.*, 2014). En el caso de *Medicago trunculata*, Rose *et al.* (2006) utilizaron fragmentos de hojas para el estudio histológico de la formación de raíces inducidas por auxina. Los trabajos pioneros en especies leñosas, utilizando peciolo de hoja para estudiar el EA fueron realizados en *Hedera hélix* (Geneve *et al.*, 1989; Geneve y Kester, 1991), sistema también utilizado para estudiar la pérdida de la capacidad de enraizamiento asociada al cambio de fase (Woo *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1995). En castaño, se emplearon cotiledones para estudiar ciertos factores que regulan el EA (Giovannelli y Rinaldi, 2009).

La pérdida de la capacidad de EA asociada a la maduración del árbol, es una de las principales limitaciones en la propagación clonal de árboles adultos seleccionados (Abarca y Díaz-Sala, 2009; Miguel y Marum, 2011; Wendling *et al.*, 2014; Legué *et al.*, 2014; Rasmussen *et al.*, 2015). El cambio de fase o transición de la fase juvenil a la fase adulta, es un proceso complejo que afecta a muchas características pero de forma diferente en diferentes especies (Poethigh, 1990; Hackett y Murray, 1993). La pérdida progresiva del potencial morfogenético en especies leñosas con el incremento de la edad fisiológica y del estado



ontogenético durante el cambio de fase está descrita desde hace años (Fortanier y Jonkers, 1976; Bonga, 1982; Greenwood, 1987, 1995; Haffner *et al.*, 1991; Greenwood y Hutchison, 1993; Hackett y Murray, 1993; Rasmussen y Hunt, 2010). Esta pérdida de capacidad morfogenética afecta negativamente a la capacidad de regeneración de brotes adventicios, raíces y embriones somáticos (Greenwood, 1995; Day *et al.*, 2002; Díaz-Sala, 2014).

El sistema experimental de dos líneas de brotes *in vitro* de castaño del mismo genotipo, pero diferente estado ontogenético utilizado en este trabajo, constató la pérdida de capacidad morfogenética asociada al cambio de fase (Sánchez y Viéitez, 1991). En estaquillas de *Tectona grandis*, se estableció una correlación entre el incremento en edad del progenitor de las estaquillas y la pérdida de la capacidad de enraizamiento (Husen y Pal, 2006). Por otra parte en gimnospermas se ha descrito otro sistema basado en la diferente capacidad de enraizamiento en respuesta a la auxina de estaquillas de hipocótilos y epicótilos de plántulas de *Pinus taeda* (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Busov *et al.*, 2004) y *P. radiata* (Sole *et al.*, 2008). Además, un sistema similar al de pino, ha sido extrapolado a *Arabidopsis* para estudiar la pérdida de la capacidad de enraizamiento asociada a la maduración (Díaz-Sala *et al.*, 2002).

El sistema de hojas de castaño desarrollado en esta Tesis, también permite estudiar la pérdida de la capacidad de enraizamiento asociada a la maduración, ya que los porcentajes y la cinética de enraizamiento de cada línea de cultivo, juvenil o adulta, son muy similares en brotes y hojas. En ambos sistemas, la capacidad de enraizamiento depende del estado ontogenético del material de partida, de forma que los explantos procedentes de material de la copa, bien brotes u hojas son incompetentes para enraizar tras el tratamiento auxínico. En nuestro sistema de hojas, hemos utilizado las tres primeras hojas expandidas que son las más jóvenes cronológicamente, hay que tener en cuenta que el brote en su período de cultivo de 4 semanas, también experimenta un envejecimiento fisiológico, y que también puede traducirse en una pérdida de capacidad rizogénica si se incrementa el periodo de subcultivo. Hemos comprobado que con el aumento de edad de los brotes (prolongando a 6 semanas el periodo de subcultivo) se reduce significativamente la capacidad de enraizamiento (datos no mostrados). Este mismo envejecimiento fisiológico puede verse reflejado en las hojas más basales del brote. Rasmussen *et al.* (2015) desarrollaron un sistema en guisante para estudiar los diferentes tipos de envejecimiento, el ontogenético, el cronológico y el fisiológico. Estos autores mostraron que la pérdida de la capacidad rizogénica estaba asociada al cambio ontogenético experimentado durante la transición del estado vegetativo al de floración.

El declive en la capacidad rizogénica asociada a la maduración, al menos en especies leñosas, es el resultado de una pérdida de competencia y plasticidad de las células para iniciar la cascada de señalización que dirige el proceso de EA en respuesta a la auxina, a la pérdida de un tipo específico de células o a la insensibilidad de las células de percibir la señal auxínica que es específica para la organización del meristemo radicular (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Hutchison *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2003; Bräutigam *et al.*, 2013; Díaz-Sala, 2014). Como ya se ha demostrado en otros trabajos, el material adulto responde a la auxina en términos de división celular, sin embargo estas divisiones dan lugar a la formación de callo pero no son capaces de rediferenciarse para organizar el primordio radicular adventicio (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999; Greenwood *et al.*, 2001). Por otra parte, los diferentes niveles endógenos de auxina, no parecen ser la causa de la pérdida de la capacidad de enraizamiento en los brotes de castaño (Ballester *et al.*, 1999), roble (Vidal *et al.*, 2003) o en pino (Díaz-Sala *et al.*, 1996) ya que el material adulto presenta concentraciones superiores al material juvenil. En general son muchos los cambios experimentados durante la maduración y que conllevan a una pérdida de capacidad de regeneración, entre ellos la alteración de la homeostasis de auxinas en los tejidos (Rasmussen *et al.*, 2015).

En resumen, este estudio confirma que ambos sistemas experimentales de brotes y hojas de castaño, presentan una respuesta similar de enraizamiento, previo ajuste del tratamiento auxínico. Por lo tanto, hemos desarrollado un nuevo sistema experimental simple y sincrónico, cuya respuesta a la auxina permite no solo estudiar el proceso de inducción sino también, al igual que el de brotes, la pérdida de la capacidad de enraizamiento que tiene lugar con la maduración en el árbol. Además, el sistema de hojas ofrece ciertas ventajas con relación al sistema de brotes ya que se incrementa el número potencial de muestras para los estudios de enraizamiento, lo que además supone una reducción de mano de obra y costes en el mantenimiento y proliferación de los cultivos. La respuesta rizogénica se focaliza en la base del peciolo, facilitando de esta manera la localización tisular de la respuesta en los estudios adicionales. Otra de las ventajas, es que evita los efectos colaterales potencialmente causados en el brote por el TPA y excluye otros procesos de desarrollo que pueden tener lugar en el brote de forma simultánea al enraizamiento tras la aplicación de auxinas exógenas. Todas estas ventajas hacen del sistema adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares que controlan la formación de RAs.

## 2. RESPUESTA RIZOGÉNICA A LA APLICACIÓN DE NPA

La biosíntesis, metabolismo, transporte y vías de señalización de la auxina, ejercen importantes efectos en varios aspectos fisiológicos de desarrollo, entre ellos en la iniciación y desarrollo de raíces. En diversos trabajos se han utilizado inhibidores del transporte auxínico, como el NPA o el TIBA, confirmando su efecto negativo en el desarrollo de la raíz primaria (Rahman *et al.*, 2007) e inhibiendo la iniciación y desarrollo de RLs y RAs (Reed *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2003). El NPA no afecta a la concentración de auxinas, a su metabolismo ni a su conjugación pero altera el TPA tanto exógenas como endógenas necesario para desencadenar el EA (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Sukumar *et al.*, 2013). Los inhibidores del TPA podrían alterar la concentración de auxina celular, que conllevaría a cambios en la abundancia de PIN1 (Peer *et al.*, 2011). En este trabajo hemos evaluado el efecto del tiempo de exposición al NPA de los brotes tratados con auxina, así como el momento de su aplicación durante la inducción y el desarrollo de las raíces en el sistema de hojas.

Tanto la respuesta rizogénica como el efecto inhibitor del NPA en el enraizamiento de las hojas (porcentaje y emergencia) se vieron afectados por el medio de cultivo. Esto puede ser debido al diferente contenido en  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$  que inhiben el crecimiento de la raíz. Otro factor a tener en cuenta es el contenido en  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  que inhiben la iniciación del EA (Takahashi *et al.*, 2003). Está demostrado que la nutrición mineral de las plantas es un factor determinante en el EA, y alguno de los nutrientes puede afectar a enzimas implicadas en el catabolismo de auxinas (revisado en Da Costa *et al.*, 2013). Por otra parte, el medio MS lleva un mayor contenido de zinc, implicado en la biosíntesis del triptófano, precursor de la auxina (Blazich, 1988) y componente estructural del ABP1 (Tomas *et al.*, 2010), lo cual puede estar relacionado con la propia homeostasis de la auxina y su transporte. En base a nuestros resultados, hemos seleccionado el medio GD dado que favorece la formación de un sistema radicular más eficiente, con más RLs y además hay un mayor efecto inhibitor por el NPA en este medio.

En otros trabajos ya se había evaluado el papel de las auxinas y su transporte en la formación de RAs (Díaz-Sala *et al.*, 2002; Sorin *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2009; Sukumar *et al.*, 2013), así como el efecto represor de los inhibidores del TPA, como el NPA (Greenwood *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2010; Negishi *et al.*, 2014; Mauriat *et al.*, 2014). En castaño la aplicación de NPA retrasó la emergencia de las raíces, tanto en brotes como en hojas, independientemente del tratamiento auxínico aplicado y del momento de su aplicación. Una respuesta similar se observó en otras especies como en

*Pinus taeda* L. (Greenwood *et al.*, 2001) y *Quercus robur* L (Vidal *et al.*, 2003). Además produjo una fuerte inhibición de la inducción del enraizamiento y un descenso en el porcentaje de brotes enraizados cuando el NPA fue aplicado de forma simultánea al tratamiento auxínico (AIB 75  $\mu$ M/24h). En las hojas el efecto inhibitor del NPA, aplicado conjuntamente con el AIB durante 5 días, es mayor generando un gran declive en el porcentaje de enraizamiento. Esta respuesta fisiológica esta correlacionada con los cambios moleculares que tienen lugar como consecuencia de la alteración de la ruta de señalización auxínica necesaria para el desarrollo del proceso de enraizamiento. Estos resultados sugieren que el NPA afecta a la creación de un gradiente de auxinas adecuado, para que se establezcan puntos máximos de concentración en el nicho de las células diana necesario para la iniciación del meristemo radicular como ya se vio que ocurría en *Arabidopsis* (Laskowski *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2014). El hecho de que la aplicación de NPA durante 5 y 8 días, a las muestras tratadas con AIB mediante “dipping”, no haya afectado negativamente al porcentaje de enraizamiento, sugiere que la dosis de NPA aplicada no fue suficiente para bloquear la alta concentración de auxina aplicada. Otra posible explicación, es que sea necesaria la aplicación simultánea de ambos compuestos para que el NPA inhiba la inducción del enraizamiento. El incremento en el porcentaje de raíces desarrolladas fuera del callo basal en los brotes tratados con AIB mediante “dipping” y posteriormente con la aplicación de NPA, sugiere que la inhibición del TPA por el NPA es local, en la zona basal del brote en contacto con el NPA y que la capacidad de difusión del NPA en la planta es muy baja, como ya indicaron Reed *et al.* (1998). Una respuesta similar se observó en *Pinus taeda* L. en el que el NPA afectó al desarrollo de raíces en la base pero no al de las raíces desarrolladas a lo largo del tallo (Greenwood *et al.*, 2001). Esta hipótesis del efecto local del NPA también podría explicar el hecho de que el NPA no afecte al desarrollo de RLs en los brotes tratados mediante “dipping” pero sí a los tratados con AIB 75  $\mu$ M/24h, ya que en el caso del “dipping” las raíces se desarrollan fuera del contacto con el medio de cultivo y del NPA y con el otro tratamiento se desarrollan en el callo basal e incluidas en el medio de cultivo, en contacto con el NPA desde su emergencia. El menor desarrollo de RLs parece ser debido a que el NPA bloquea el transporte basipétalo de auxinas impidiendo la formación de puntos máximos de auxinas necesarios para la inducción de las divisiones asimétricas transversales con las que se inicia el desarrollo del primordio radicular (Reed *et al.*, 1998; Casimiro *et al.*, 2001; Konieczny *et al.*, 2009). En un sistema completamente diferente durante la germinación y desarrollo de raíz de *Pisum sativum*, la aplicación de NPA disminuyó ligeramente el número de RLs aunque no afectó a la elongación de la raíz primaria (Kolbert *et al.*, 2008).

Algunos trabajos sugieren que el NPA únicamente afecta al transporte de AIA (Rashotte *et al.*, 2003) y que no puede afectar a la respuesta del AIB para desarrollar RLs (Kolbert *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta estas hipótesis y en base a nuestros resultados, no podemos confirmar que en castaño el NPA inhiba el transporte de AIB. La teoría más aceptada es que actúa sobre el AIA, producto de la oxidación y rápida transformación del AIB una vez que ha entrado en la célula. Tampoco podemos descartar, como ya propuso Fujita y Syono (1996), que el efecto inhibitor del NPA se lleve a cabo por otras vías de inhibición independientes de las auxinas y del TPA.

El efecto inhibitor del NPA en el enraizamiento de las hojas dependió del momento de su aplicación tras el tratamiento auxínico. El retraso en su aplicación disminuyó la inhibición, siendo crítica su aplicación durante las primeras 48 horas ya que el porcentaje de enraizamiento fue inferior al 50%. Esta respuesta fue muy similar a la observada en estaquillas de hipocótilos de *Pinus tadea* (Díaz-Sala *et al.*, 1996) en las cuales el NPA ejerció un efecto inhibitor en el desarrollo de RAs únicamente durante las primeras 48 horas del periodo de inducción. La aplicación de NPA a las hojas, una vez finalizado el tratamiento inductor con auxina, no afectó al porcentaje de enraizamiento, simplemente retrasó la emergencia de las raíces. Esto sugiere que en esos cinco primeros días ocurrieron las primeras divisiones que originaron las células iniciales de raíz. La inclusión posterior de NPA bloqueó sus divisiones retrasando la emergencia, pero cuando se retiró el NPA las células que ya habían adquirido el destino celular de meristemo de raíz fueron capaces de retomar las divisiones celulares organizadas para formar la futura raíz. El retraso observado en la emergencia de la raíz, podría ser debido a que el NPA afectó a la ruta de señalización auxínica que dirige la organización del meristemo radicular (Greenwood *et al.*, 2001). Estos resultados, conjuntamente con el bloqueo de la emergencia de raíces cuando el NPA se mantuvo en el medio durante 25 días, indicaron que el NPA inhibió no solo la iniciación de raíces, sino también el desarrollo y elongación de las mismas. La presencia continuada de NPA impidió que los meristemoides incipientes, o los grupos iniciales de células con identidad de raíz, fueran capaces de continuar con sus divisiones para formar la futura raíz. El efecto del NPA en la elongación radicular fue puesto de manifiesto en otros estudios (Zheng *et al.*, 2011).

Además del momento de aplicación del NPA, la duración del tratamiento con NPA también afectó negativamente al tiempo de emergencia de raíces y al porcentaje, inhibiéndose completamente su formación en los brotes cuando el NPA se aplicó durante 30 días. Dicho retraso en la emergencia de raíces y reducción en el porcentaje de enraizamiento con el incremento del tiempo de exposición al NPA, fue también descrito en un sistema de brotes *in*



*vitro* de *Q. robur* (Vidal *et al.*, 2003). Estos datos confirmaron que el TPA es necesario para desencadenar el proceso de EA. Aunque en el presente estudio, no se evaluaron diferentes concentraciones de NPA, en otras especies se ha comprobado que la inhibición del enraizamiento depende de la dosis de NPA y de auxinas aplicadas, como en el caso de *Mesembryanthemum crystallinum* (Konieczny *et al.*, 2009) y de *Arabidopsis thaliana* (Sukumar *et al.*, 2013). Por el contrario, en *Malus domestica*, el NPA no afectó al número de raíces desarrolladas en ninguna de las dosis ensayadas (Harbage y Stimart, 1996b).

En base a nuestras observaciones y a la información recopilada en la bibliografía existente, el TPA es indispensable para la inducción de las células competentes para el enraizamiento, para la iniciación de la proliferación celular, para la emergencia de las raíces y para el establecimiento del correcto patrón de desarrollo de la raíz. El NPA inhibe el TPA, alterando la presencia y distribución específica en la célula de los canales de salida de las auxinas, actuando sobre las proteínas PIN y las ABCBs (Kazan, 2013). En los trabajos de Xu *et al.* (2005) y Sukumar *et al.* (2013) se demostró que la abundancia de las proteínas PIN1 y ABCB 19 afecta a la formación de RAs, ya que su sobreexpresión incrementa el número de raíces desarrolladas, dirige el transporte de auxinas y su acumulación local y temporal en los puntos de iniciación del enraizamiento. Mediante ensayos de unión y modelado estructural se identificaron a las proteínas ABCBs como la principal diana de actuación del NPA (Rojas-Pierce *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010). Por todo ello, una posible explicación del efecto inhibitorio del NPA en el EA de castaño, puede ser la alteración de la abundancia y distribución de los canales de salida de las auxinas y de esta manera alterando el gradiente necesario para desencadenar el proceso de enraizamiento (Bailly *et al.*, 2008; Nagashima *et al.*, 2008).

La elevada capacidad de respuesta rizogénica de los brotes tratados mediante “dipping” y seguidamente con NPA, sugiere que existen cambios muy rápidos en el transporte de auxinas, que determinan la activación celular y la iniciación del proceso de enraizamiento en respuesta a la aplicación exógena de auxinas. En algunos casos, se observaron cambios tempranos (a los tres minutos) en respuesta a auxinas, probablemente debidos a la inhibición de la endocitosis de las unidades de membrana que presentan los complejos de proteínas transportadoras con las proteínas PIN (Paciorek *et al.*, 2005). Estos cambios pueden ser explicados por la regulación a nivel transcripcional de las rutas de señalización. Las proteínas ABP1 actúan en la señalización auxínica actuando como receptores de auxinas, regulando su transporte (y la actividad de las proteínas PIN) y participando en la reorganización del citoesqueleto (Feldwisch *et al.*, 1992; Shi y Yang, 2011; Čovanová *et al.*, 2013; Sauer *et al.*, 2013; Grones y Friml, 2015). Las proteínas ABP1 participan en la señalización auxínica pero no regulando la



respuesta transcripcional, sino que están implicadas en la regulación del potencial de membrana y en los mecanismos de polarización de los canales de transporte de auxinas (Paciorek *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010). El incremento de los niveles de auxinas, induce su conjugación con la proteína ABP1, inhibe la endocitosis y promueve el eflujo de auxinas (Nagawa *et al.*, 2012; Čovanová *et al.*, 2013). Además, las proteínas transmembrana receptores-kinasa (TMK1) interactúan con los complejos ABP1-auxina y traducen la señal auxínica al citosol de la célula activando la cascada de señalización (Xu *et al.*, 2010, 2014; Chen *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013).

Diversos trabajos apuntan a que las proteínas ABP1 actúan como receptores que regulan el transporte de auxinas a través de la planta (Scherer, 2011). Como ya sugirió Greenwood *et al.* (2001) es posible que el NPA y el AIA puedan competir por la unión a las proteínas ABP1 y/u otros receptores de auxinas y por ello cuando el NPA es aplicado tras el tratamiento con AIB solo se produce un retraso en la emergencia de las raíces y no un efecto inhibitor del proceso de enraizamiento. De acuerdo con esta hipótesis y junto con nuestros resultados el efecto competitivo del NPA y las auxinas por la unión a receptores puede desencadenar la inhibición del proceso de enraizamiento.

En resumen, nuestros resultados muestran que la aplicación de NPA causa el retraso de la emergencia de las raíces tanto en brotes como en hojas independientemente del momento de su aplicación, y este retraso es mayor al incrementar el tiempo de exposición al inhibidor. Una vez se ha producido la inducción del enraizamiento el efecto del NPA es temporal y reversible, ya que cuando el NPA se retira del medio, el meristemo originado es capaz de retomar su desarrollo y cuando es mantenido la emergencia de las raíces es bloqueada. Esto demuestra la importancia de la ruta de señalización auxínica y el establecimiento del gradiente tanto durante la inducción como durante el desarrollo de los primordios (Laskowski *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2014).

### 3. CARACTERIZACIÓN GÉNICA

Con el fin de identificar genes involucrados en la inducción y desarrollo de RAs, hemos aislado genes de la familia GRAS (*CsSHR1*, *CsSHR2*, *CsSCL3* y *CsSCR1*) que codifican para putativos factores de transcripción implicados en diversos procesos de desarrollo (Pysh *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2000; Bolle, 2004). Además, hemos caracterizado otros tres genes que podrían estar implicados en la homeostasis de auxinas, el *CsGH3.2* (Staswick *et al.*, 2005;

Westfall *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011) y el *CsUGT* (Gachon *et al.*, 2005; Woodward, y Bartel, 2005; Tognetti *et al.*, 2010; Ludwig-Müller, 2011) y en la iniciación y el desarrollo radicular, el *CsENOD93* (Kyoung *et al.*, 2003; Busov *et al.*, 2004).

### 3.1. FAMILIA GRAS

Las secuencias aminoacídicas predichas para *CsSHR1*, *CsSHR2*, *CsSCL3*, *CsSCR1* contienen el dominio característico de la familia GRAS en el extremo carboxi-terminal (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Pysh *et al.*, 1999; Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004), así como sus cinco motivos conservados (Fig. 27). Entre ellos, los motivos LHR I y LHR II, dos regiones ricas en residuos de leucina que establecen las uniones proteína-proteína o ADN-proteína (Pysh *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000; Bolle, 2004; Tian *et al.*, 2004). Cada uno de estos motivos se divide en dos subunidades, A y B, separadas por una región que contiene residuos de prolina y que interrumpe la estructura de la hélice  $\alpha$  (Pysh *et al.*, 1999). Al tratarse de putativos factores de transcripción es frecuente identificar en su secuencia NLSs. La secuencia *CsSCR1*, dentro del motivo LHR I, presenta el péptido LXXLL que participa en la unión de la proteína a receptores nucleares para la activación de la transcripción (Heery *et al.*, 1997), lo cual sugiere una localización nuclear de esta proteína. Sin embargo dicha secuencia, no está presente en las otras tres proteínas identificadas en esta memoria. Richards *et al.* (2000) propusieron la similitud de la familia GRAS con la familia de proteínas animales STAT debido a la presencia de motivos LHRs y de esta secuencia de localización nuclear (LXXLL). Otros autores describieron la presencia de motivos característicos que actúan como NLS. Di Laurenzio *et al.* (1996), localizó el dominio básico de las proteínas bZIP que actúa como NLS, en el extremo amino terminal de la secuencia en la proteína *AtSCR*. Este dominio no se encuentra en ninguna de las secuencias GRAS de castaño caracterizadas en el presente trabajo (Fig. 27). También se han identificado señales de localización nuclear en la región LHR I B de las proteínas DELLA (Tian *et al.*, 2004). Independientemente de la localización de NLSs, se ha observado la acumulación de las proteínas de esta familia en el núcleo (Silverstone *et al.*, 1998; Morohashi *et al.*, 2003) Las proteínas PAT1, son la excepción y presentan localización citoplasmática (Bolle *et al.*, 2000).

Entre los dos motivos LHRs se sitúa el motivo VHIID, donde se localizaron los residuos característicos (P-N-H-D-Q-L) absolutamente conservados en todas las secuencias evaluadas tanto por su presencia como por su ubicación. Además en este motivo, en las 4 secuencias de castaño, se localizaron dos péptidos característicos VHIID y LRITG, aunque en este caso no están totalmente conservados. En este motivo también se han descrito regiones altamente

conservadas características de cada subgrupo de la familia GRAS, en concreto el descrito en la familia PAT1 (AMQILFEVCP) se identificó en la secuencia homóloga CsSCL3 (Tian *et al.*, 2004). Dado que funcionalmente al motivo VHIID se le atribuye la participación en la unión proteína-ADN junto con las regiones LHRs (Pysh *et al.*, 1999), su presencia en las secuencias de castaño parecen conferirle también esta posible función. Al final de las secuencias se localizaron los motivos PFYRE y SAW, que a pesar de que no están estrictamente conservados en la familia génica y de que no se conoce su función, presentan residuos característicos altamente conservados, también en las proteínas caracterizadas en castaño, por lo que se les atribuye un importante papel en la integridad estructural de la proteína o en su actividad enzimática (Hao *et al.*, 2012). El alto grado de conservación de los cinco motivos característicos de la familia en el extremo carboxi-terminal y de ciertos aminoácidos presentes en ellos nos permite identificar estas secuencias como miembros de la familia GRAS, que van a actuar como factores de transcripción específicos de plantas e involucrados en procesos de desarrollo, muy conservados evolutivamente.

Por el contrario, el extremo amino-terminal de las proteínas de la familia GRAS es altamente divergente, como también muestran las proteínas caracterizadas. Estas regiones se caracterizan por ser “intrínsecamente desordenadas” (Fig. 20, 22 y 24) lo que le permite adquirir la conformación adecuada para la unión a diferentes ligandos permitiendo que actúen en el reconocimiento molecular durante el desarrollo de la planta (Sun *et al.*, 2011, 2012). Las proteínas de la familia GRAS juegan un papel crucial en diversos procesos de desarrollo de la planta, en la señalización y en la integración de la señal de multiplex reguladores de crecimiento y es el extremo amino el que actúa en el reconocimiento de moléculas características y de unión a ellas. Por ello, a pesar del alto grado de divergencia pueden presentar ciertos motivos conservados que se caracterizan por contener residuos hidrofóbicos y aromáticos repetitivamente (Sun *et al.*, 2011). Además, en el extremo amino-terminal es frecuente encontrar regiones homopoliméricas de ciertos residuos que promueven el desorden de esta región (Sun *et al.*, 2011). En las secuencias CsSCL3 (Fig. 19) y CsSHR1 (Fig. 21) se encontró una región rica en residuos de ácido aspártico y de treonina, respectivamente. A pesar de que el motivo conservado XI, caracterizado en la proteína AtSCL1 no parece presentar alta homología con la secuencia CsSCL3, sí que observamos que esa región de la proteína cumple con las características descritas, presentando residuos hidrofóbicos intercalados entre residuos ácidos. Este tipo de motivos está asociado con la activación de la transcripción. El alto grado de divergencia del extremo amino-terminal nos indica la gran divergencia sufrida por esta familia génica, lo cual le permite participar en una amplia

variedad de funciones, facilitando que cada uno de estos genes se especialice y focalice su función (Bolle, 2004; Abarca *et al.*, 2014). Los sitios de fosforilación juegan un papel importante en las interacciones de las proteínas GRAS. La fosforilación de residuos, más frecuente en la región amino-terminal puede introducir cambios alostéricos que desencadenen diversos efectos correlacionados con la estabilidad, la asociación con el ADN y la localización nuclear, para responder a diversos estreses y en la señalización del ácido giberélico y de los factores de nodulación entre otros (Czikkel y Maxwell, 2007; Sun *et al.*, 2011). Estos eventos de fosforilación que modulan la actividad son similares en las proteínas STATs que son activadas por receptores quinasa, pero no se conoce que quinasas están desempeñando esta función (Morohashi *et al.*, 2003).

Por último, la secuencia CsSHR1 posee una treonina en la posición T250 que no está presente en CsSHR2. Este residuo equivalente a la T289 de AtSHR es importante para el movimiento de la proteína SHR desde la estela a la endodermis y así mantener el patrón radial radicular (Gallagher y Benfey, 2009). Esta diferencia entre las dos proteínas caracterizadas en castaño podría estar asociada a que CsSHR1 actúe en la formación y diferenciación del córtex y la endodermis, de forma similar a la proteína caracterizada en *Arabidopsis* y CsSHR2 se haya especializado en alguna otra función.

Finalmente, el análisis filogenético (Fig. 27) nos permitió incluir las secuencias caracterizadas en tres clados diferentes de la familia (Bolle, 2004). La información disponible sobre otras proteínas ortólogas caracterizadas en otras especies junto con el análisis del patrón de expresión nos permitirá hacer una primera aproximación sobre la funcionalidad de las proteínas.

### 3.2. FAMILIA GH3

En este trabajo se identificó una secuencia que denominamos *CsGH3.2*, la cual presenta los tres motivos característicos de la familia GH3 (SSGTSAGERK, YASSE, YRVGD), implicados en la conjugación a ATP/AMP (Chang *et al.*, 1997). El análisis filogenético incluye a *CsGH3.2* dentro del grupo II de la familia GH3 (Fig. 30). Los genes de esta familia son de respuesta a auxinas cuya expresión está controlada por las ARFs ya sea promoviéndola o reprimiéndola (Guilfoyle y Hagen, 2007). Las proteínas de la familia GH3 catalizan la conjugación de aminoácidos a diferentes sustratos y en función del sustrato empleado se clasifican en tres subgrupos: el grupo I actúa sobre el ácido jasmónico, el grupo II actúa sobre el AIA y el grupo III actúa sobre el benzoato (Staswick y Tiriyaki, 2004; Westfall *et al.*, 2012). Ya que el análisis filogenético permite agrupar estas proteínas en función de su especificidad

de sustrato, posiblemente esta familia génica se haya originado previamente a la diversificación de especies y por la duplicación de genes tras su especialización y adquisición de especificidad de sustrato. El alineamiento con la proteína de *Vitis vinífera*, caracterizada estructuralmente (Peat *et al.*, 2012), permite localizar los aminoácidos que conforman el centro catalítico y la unión al ATP/AMP en CsGH3.2 (Fig. 30). La presencia de un residuo de arginina en la posición 115 de la secuencia sugiere que va a catalizar la formación de conjugados AIA-Asp (Westfall *et al.*, 2012).

El alto grado de conservación, tanto de los motivos característicos como de los residuos implicados en la actividad enzimática en otras proteínas homólogas, indica que la secuencia predicha en castaño, debe tener la capacidad de participar en la homeostasis de auxinas en los tejidos (Staswick y Tiriyaki, 2004; Staswick *et al.*, 2005; Westfall *et al.*, 2010), conjugando el AIA con ácido aspártico y de esta manera reducir los niveles de AIA activo de la célula a niveles óptimos promoviendo su catabolismo.

En la región promotora 5'UTR de *CsGH3.2* se localizan varios motivos de regulación de la expresión (Fig. 29). Entre ellos cabe destacar las cajas CAAT y TATA que participan en la unión a factores de transcripción. El motivo “5'UTR Py-rich stretch”, parece conferir la capacidad de alcanzar altos niveles de expresión en las raíces y flores, gracias a la presencia conjunta de la caja TATA (Viana *et al.*, 2011). La presencia del motivo “LAMP-element”, sugiere que el gen de castaño responde a la luz, lo que concuerda con lo descrito en otras proteínas de esta familia que responden a la luz a través de los fitocromos A y B y criptocromos (Nakazawa *et al.*, 2001; Woodward y Bartel, 2005; Ludwig-Müller, 2011; Ostrowski y Jakubowska, 2013). La luz es uno de los factores ambientales clave en el crecimiento y desarrollo de la planta, y existen factores moleculares que vinculan la luz con la ruta de señalización auxínica, se trata de genes de respuesta a auxina involucrados en la vía de percepción de la luz. Por ejemplo el gen *PsGH3.5* incrementa los niveles de transcripción en respuesta al tratamiento lumínico y por el contrario la actividad enzimática se incrementa bajo condiciones de oscuridad (Ostrowski y Jakubowska, 2013) y el gen *DFL1*, de la familia GH3, conecta la señalización de la luz y de la auxina de manera que inhibe la iniciación de RLs suprimiendo las divisiones de las células del periciclo (Nakazawa *et al.*, 2001).

### 3.3. FAMILIA UDP-GLICOSILTRANSFERASA (UGTs)

La secuencia CsUGT presenta en el extremo C-terminal el dominio PSPG (“plant secondary product glycosyltransferase box”), secuencia consenso de 44 aminoácidos característica de la familia 1 de las glicosiltransferasas, conocidas como UDP-



glicosiltransferasa (UGTs). A pesar de tratarse de un dominio conservado, el motivo PSPG es altamente divergente en esta familia de proteínas (Fig. 34), se une al donador de azúcares y cataliza la glicosilación (Paquette *et al.*, 2003; Weis *et al.*, 2008). Además se localizaron otros dos motivos semiconservados (motivo 2 y motivo 3) que se cree que afectan a las propiedades catalíticas de la glicosilación y a la especificidad de sustrato (Fig. 33). Especialmente el motivo 3 se cree que presenta la región de unión a la molécula aceptora, dado el amplio rango de sustratos posibles es el motivo menos conservado de los tres (Kumar *et al.*, 2012). El centro catalítico de unión a la molécula aceptora y donadora se localiza entre el dominio N-terminal y C-terminal de las proteínas UGTs.

Muchas proteínas UGTs han sido caracterizadas funcionalmente y asociadas con glicosilación de hormonas, aceptores lipofílicos, metabolitos secundarios y xenobióticos (Ross *et al.*, 2001; Barvkar *et al.*, 2012). La glicosilación modula la actividad, la localización subcelular, y las propiedades químicas como solubilidad y estabilidad pudiendo reducir la toxicidad de ciertos compuestos. Diversos trabajos han evaluado la relación de las UGTs con diversas hormonas, ya que el incremento o disminución de la actividad de estas enzimas altera los niveles hormonales y como consecuencia el crecimiento de las raíces y hojas, la floración, la producción de semillas o el crecimiento del brote y en la respuesta defensiva a diversos estreses ambientales (Barvkar *et al.*, 2012; Khorolragchaa *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). De esta manera participan en el control metabólico de diversos procesos durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Por ejemplo el gen *UGT85U1* incrementa la tolerancia al estrés salino y oxidativo gracias a que incrementa los niveles de auxinas. Los niveles de expresión de este gen se incrementan exclusivamente en las raíces y más aún en la zona apical. La sobreexpresión del gen reduce el crecimiento de la raíz primaria, pero fomenta el desarrollo de RLs y RAs por la alteración del balance hormonal, ya que incrementa los niveles de auxinas, exclusivamente en la raíz. Además, su sobreexpresión también altera los niveles de expresión de otros genes implicados en el TPA y el desarrollo de la raíz como el PIN2 y el SHR (Ahrazem *et al.*, 2015)

El análisis de homología relaciona la secuencia caracterizada en castaño, CsUGT, con otras antocianidina-3-O-glucosido UGT (Tabla 30) y el análisis filogenético la incluye con los grupos UGT79B, el cual se caracterizó como citoquinin-GT, y que podría actuar regulando los niveles de citoquininas activas libres mediante su glicosilación (Yonekura-Sakakibara y Hanada, 2011). En base a las clasificaciones más actuales se trata de un gen perteneciente al grupo A (Fig. 35)(Ross *et al.*, 2001; Barvkar *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). En el caso de CsUGT, los residuos que participan en la unión a las moléculas donadoras de azúcares están



escasamente conservados con respecto a la secuencia de *Vitis* (VvUGT), caracterizada estructural y funcionalmente por participar en la formación de antocianinas, y a la de *Medicago* (MtUGT85H2) que actúa como flavonoide-GT (Li *et al.*, 2007; Wang, 2009). Ello posiblemente sea debido a que las secuencias proteicas de esta familia son muy diferentes a pesar de tener una estructura tridimensional y actividad muy conservada. En el estudio realizado por Li *et al.* (2007), las secuencias evaluadas presentan un plegamiento muy similar a pesar de tener un porcentaje de identidad muy bajo (20 y 22 %). Las GTs pueden tener una estricta especificidad de sustratos o ser capaces de glicosilar un amplio rango de sustratos (Osmani *et al.*, 2009) pero el análisis de la secuencia de CsUGT o el análisis filogenético no permitió identificar la especificidad de sustrato. A pesar de la gran divergencia de esta familia génica (Fig. 33) en la secuencia de castaño encontramos los residuos His-21 y Asp-118. Li *et al.* (2007) y Wang (2009) identificaron este residuo de histidina por ser indispensable para la actividad enzimática de las proteínas de esta familia y, sin ser esencial en la actividad confirmaron la interacción de esta histidina con un residuo de Asp.

Muchas UGTs probablemente aparecieron después de la divergencia de las especies por lo que los genes fueron surgiendo de forma independiente en las diversas especies. Esto puede explicar porque la secuencia de castaño no refleja la especificidad de sustrato y función y dificulta el análisis de la secuencia de esta familia génica (Gachon *et al.*, 2005). La gran divergencia de UGTs en plantas puede ser una adaptación a la variedad de ambientes terrestres inhabitados por las plantas vasculares (Yonekura-Sakakibara y Hanada, 2011)

### 3.4. FAMILIA DE LAS NODULINAS TEMPRANAS

En el estudio realizado, también se aisló un gen de pequeño tamaño cuya proteína, CsENOD93 contiene el dominio característico de las nodulinas tempranas 93. En la región promotora presenta una caja TATA de unión a factores de transcripción y cuatro elementos de respuesta a la luz, lo cual sugiere que su expresión pueda estar regulada por la luz aunque esto no ha sido objeto de estudio en este trabajo. La presencia de dos dominios transmembrana, apunta a que pudiese tratarse de una proteína de membrana (Fig. 36). Su elevada homología con la proteína OsENOD93-1 de arroz con localización mitocondrial, así como otras ENOD93 caracterizadas, podría situar a CsENOD93 en la membrana mitocondrial, o en cloroplastos de acuerdo con otras proteínas de esta familia (Bi *et al.*, 2009), aunque no se ha determinado su localización subcelular. Estas proteínas también se caracterizan por presentar un alto contenido en alaninas como ya se había observado en proteínas homólogas de otras especies (Kouchi y Hata, 1993; Yan *et al.*, 2015). Estos genes fueron caracterizados por

participar en el proceso de nodulación en leguminosas y en la fijación de nitrógeno (Fischer *et al.*, 2013). En particular los genes de nodulinas tempranas (“early nodulin”) se inducen durante las primeras etapas del proceso de nodulación, participan en la respuesta a la infección y en la iniciación de la organogénesis de nódulos de raíz en leguminosas (Mylona *et al.*, 1995). Sin embargo su presencia no es exclusiva de las leguminosas, encontrándose genes homólogos en otras especies, originados a partir de genes preexistentes de hemoglobinas duplicados y divergentes (Reddy, 1998). Diversos estudios también han implicado estos genes en procesos como el uso eficiente del nitrógeno (Sofi y Wani, 2007; Bi *et al.*, 2009; Kant *et al.*, 2010) y la respuesta a la infección (Pawlowski *et al.*, 1997; Dafoe *et al.*, 2013). En el caso del arroz, el gen *ENOD93* se ha propuesto como uno de los genes candidatos para el desarrollo de resistencia a herbívoros (Wang *et al.*, 2015).

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN

Con el fin de caracterizar de patrón de expresión de los genes aislados en este trabajo y de otros previamente identificados en nuestro laboratorio (*CsENOD93*, *CsERF1*, *CsGH3.2*, *CsRLK*, *CsSCL1*, *CsSCL3*, *CsSHR1*, *CsSHR2* y *CsUGT*), se evaluó su expresión en los diferentes órganos y en la fase de inducción del EA. Además se comparó el patrón de expresión de las dos líneas de cultivo (P2C y P2Rb), con elevada y muy baja capacidad rizogénica, para poder identificar los genes implicados en la adquisición de la competencia celular para el enraizamiento, y sometidas al tratamiento con AIB y NPA para determinar su posible participación en la ruta de señalización auxínica.

### 4.1. EXPRESIÓN EN DIFERENTES ÓRGANOS

El análisis de expresión en los diferentes órganos de la planta reveló que los genes *CsUGT*, *CsENOD93*, *CsGH3.2*, *CsERF1*, *CsSCL1* y *CsSCL3*, presentan niveles altos de expresión en las raíces. En general, mostraron diferencias de expresión entre las distintas partes analizadas, lo cual sugiere su implicación en el desarrollo de la raíz, contribuyendo a su iniciación, al crecimiento de la zona meristemática, a la elongación, a la iniciación de RLs o bien a la maduración. El patrón de expresión de estos genes es similar al de otros homólogos previamente caracterizados, lo que nos permitió establecer una primera aproximación del posible papel que están desempeñando cada uno de ellos.

El gen *CsUGT* presenta niveles máximos de expresión relativa en las raíces, lo cual indica una mayor actividad del gen en el desarrollo radicular que en los órganos aéreos.

Dentro del amplio rango de UGTs existentes se han descrito algunos genes que presentan un patrón de expresión similar al de *CsUGT*. En *Arabidopsis* se ha caracterizado una GT que se expresa específicamente en las raíces (Vijaybhaskar *et al.*, 2008). Sin embargo esta proteína y la de castaño están muy alejadas filogenéticamente, y dado que la secuencia *CsUGT* solo contiene 46 nucleótidos de la región 5'UTR tampoco fue posible localizar en ella ninguno de los motivos característicos que se describieron en la región promotora. En maíz se caracterizaron 13 genes que se expresaban mayoritariamente en la raíz primaria de los cuales 5 estaban caracterizados funcionalmente como una hidroquinona-GT, dos antocianidinas-GT y dos-citoquininas GT (Li *et al.*, 2014). De los genes analizadas en el trabajo de Ghose *et al.* (2014), el más próximo filogenéticamente a *CsUGT* es la UGT94H1, el cual también mostró niveles de expresión bajos en tallos y en hojas. En algodón, también se caracterizaron dos UGTs que pertenecen a las flavonoide3-glucosiltransferasas, que se expresan en raíces y se asocian con el estrés osmótico y con la formación de fibras (Tai *et al.*, 2008). En nuestro trabajo hemos caracterizado una GT del grupo UGT79 que podría estar implicada en el desarrollo de la raíz pero de forma concreta en leñosas, ya que no aparece representado en el análisis de transcriptoma de raíz de algunas especies como la herbácea *Polygonum cuspidatum*, pero si en otras más próximas al castaño como en *Taxus mairei* (Hao *et al.*, 2012). Las antocianinas así como otros flavonoides se acumulan en forma glucosilada. La mayor expresión del gen *CsUGT* en las raíces debería estar asociada con un mayor contenido en antocianinas en este órgano. Los flavonoides se cree que actúan como inhibidores del transporte de auxina, en este sentido *CsUGT* podría estar actuando regulando el transporte de auxina en la raíz a través de la acción de flavonoides específicos controlando la actividad o disponibilidad de los mismos.

El gen *CsUGT* se expresa en todos los órganos analizados, pero con acumulación preferencial del mensajero en la raíz, por lo que su regulación es dependiente del órgano. En *Linum usitatissimum*, el análisis de expresión de un gran número de UGTs mostró gran variación en la expresión de los mismos en diferentes tejidos y estadios de desarrollo (Barvkar *et al.*, 2012). Todo ello indica que la expresión de los genes de esta familia varía enormemente entre ellos dependiendo del órgano y tejido.

Otro de los genes identificados en castaño, *CsENOD93*, mostró claramente una expresión asociada a órganos, concretamente a raíces y especialmente en su zona basal de la raíz, con niveles de expresión muy superiores al resto de los órganos analizados. Estas diferencias tan marcadas indican una regulación del gen no solo a nivel de órgano sino también temporal durante el desarrollo de la raíz. En base a su mayor expresión en la zona de maduración su

función no parece estar asociada a crecimiento o elongación de la raíz. Dado que es en esa zona de maduración donde se establecen las conexiones vasculares con el tejido donde se originan las raíces, los altos niveles del transcrito pudieran estar asociados con desarrollo de tejido vascular. El gen *OsENOD93-1*, asociado con el metabolismo de nitrógeno, presenta altos niveles de expresión en la zona de maduración de la raíz, localizándose en los haces vasculares, la endodermis y la epidermis, y la sobreexpresión del gen promueve la acumulación de aminoácidos en la savia del xilema (Bi *et al.*, 2009). Los genes *ENOD* se expresan en etapas tempranas del desarrollo de nódulos (Kouchi y Hata, 1993; Yang *et al.*, 1993), implicados en la desdiferenciación e iniciación de las divisiones en las células corticales (Charon *et al.*, 1997), en la diferenciación vascular (Kouchi *et al.*, 1999), o en el transporte de azúcares y pueden mediar la infección y organogénesis de nódulos (Hirsch *et al.*, 1989; Sanchez *et al.*, 1991; Mylona *et al.*, 1995; Oldroyd and Downie, 2008). Aunque no pertenecen a la misma familia, el gen *HRGP3*, correlacionado con la maduración de la raíz, presentó un patrón de expresión similar a *CsENOD93* (Ahn *et al.*, 1998). En arroz se caracterizaron dos secuencias homólogas a la proteína *CsENOD93*, aunque filogenéticamente la más próxima es la proteína *OsENod93a* el patrón de expresión se asemeja más al del gen *OsENod93b* que presentaba altos niveles de expresión en las raíces en comparación con las hojas, lo que sugiere que juega un papel específico en las mismas (Reddy, 1998).

El gen *CsGH3.2*, mostró niveles de expresión máximos en raíces y los más bajos en entrenudos y hojas. Un patrón de expresión similar fue descrito en el caso del gen *NtGH3*, con los niveles de expresión más elevados en las raíces y las yemas florales maduras, mientras que dichos niveles fueron casi indetectables en tallos y hojas maduras (Roux y Perrot-Rechenmann, 1997). También el gen de arroz *GH3-2*, implicado en la iniciación y desarrollo de RLs, mostró mayores niveles de expresión en raíces y bajos en hojas y tallos (Fu *et al.*, 2011). Los datos de expresión del gen *CsGH3.2*, indican que está regulado temporalmente durante el desarrollo de la raíz, con niveles máximos en la zona media de la raíz o zona de elongación, donde se está iniciando el desarrollo de un gran número de RLs, lo cual sugiere que pueda estar participando o ejercer una función en dicho proceso al igual que sucede con el gen *GH3-2* de arroz. Dentro de la familia GH3, también se han caracterizado otros genes asociados con el desarrollo de las raíces en *Arabidopsis*, como *GH3.2*, *GH3.3* y *GH3.9* (Khan y Stone, 2007; Yang *et al.*, 2014).

El gen *CsERF1*, codifica un factor de transcripción de respuesta a etileno. Otros genes de esta familia parecen estar involucrados en el desarrollo de RLs (Hirota *et al.*, 2007), así como en la regulación del EA (Trupiano *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2015). En el análisis realizado en

castaño, los elevados niveles de expresión del gen en la zona media y basal de la raíz, también indican que participa en el desarrollo radicular. Otros genes de esta familia con niveles de expresión relativa elevados en las raíces son el *PtaERF003* que promueve el desarrollo de RAs y RLs en *Populus* (Trupiano *et al.*, 2013), el gen *NtCEF1* que participa en la respuesta a condiciones de estrés y altera la homeostasis del balance auxinas/citoquininas (Lee *et al.*, 2005) y diversos genes AINTEGUMENTA\_like en *Arabidopsis thaliana* (Nole-Wilson *et al.*, 2005). Además, el máximo nivel de expresión detectado en las yemas axilares apunta a una posible función del gen en otros procesos de desarrollo de la planta. En este sentido, el gen *EBE*, de la familia AP2/ERF se expresa preferentemente en las yemas axilares y su sobreexpresión promueve la formación de las mismas (Mehrnia *et al.*, 2013).

Con relación al patrón de expresión en órganos de los genes analizados de la familia GRAS, encontramos dos patrones de expresión diferentes, los genes *CsSCL1* y *CsSCL3* con niveles de expresión más elevados en raíces y los genes *CsSHR1* y *CsSHR2* cuya expresión no permite asociarlos de forma directa al desarrollo radicular. En general los genes de la familia GRAS presentan mayores niveles de expresión en la raíz aunque con una función diferente o asociados a distintos tejidos (Pysh *et al.*, 1999; Czikkell y Maxwell, 2007). En castaño, los genes *CsSCL1* y *CsSCL3* mantienen estas características de la familia GRAS, sin embargo *CsSHR1* muestra niveles de expresión muy similares en todos los órganos y *CsSHR2* parece estar más activo en los tejidos aéreos de la planta. El elevado nivel de expresión del gen *CsSCL1* en las tres zonas de la raíz, concuerda con lo observado en trabajos previos y en putativos genes ortólogos como el *PrSCL1* de *Pinus radiata* (Sánchez *et al.*, 2007). Los niveles máximos detectados en la zona media de la raíz, al igual que ya se mencionó para el gen *CsGH3.2*, sugieren que *CsSCL1* participa en la regulación de la iniciación de los primordios de RLs. En el caso del gen *CsSCL3*, el incremento progresivo en los niveles de expresión a medida que avanza su estado de desarrollo, también indica que su expresión está regulada temporalmente durante el crecimiento de la raíz. Inicialmente cabría esperar un patrón similar al de los genes *AtSCL1* y *AtPAT1* de *Arabidopsis*, con los que presenta mayor homología, sin embargo el clado PAT1 al que pertenecen estos genes es una excepción en los genes de esta familia y *AtSCL1* presenta baja expresión en raíces (Pysh *et al.*, 1999) y el *PAT1* presenta unos niveles de expresión muy bajos localizados de forma similar en todos los tejidos de la planta y bajo cualquier condición lumínica. El gen *AtPAT1* codifica para una proteína citoplasmática homóloga a la familia GRAS, a la que se atribuye un papel en la ruta de señalización lumínica (Bolle *et al.*, 2000). Esta proteína bloquea uno de los primeros pasos de la señal de traducción del fitocromo A, un fotorreceptor que controla los procesos básicos



de desarrollo de la planta. Este patrón de expresión, por homología debería observarse en el gen *CsSCL3*, sin embargo en el caso del castaño es el gen *CsSHR1* el que presenta niveles de expresión similares en los órganos evaluados. Además ambos genes, *CsSCL1* y *CsSCL3*, mostraron niveles de expresión relativamente altos en las yemas axilares, lo que sugiere que pueden estar implicados en el desarrollo de meristemos en proliferación y división activa celular, como ya había sido sugerido para *CsSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007; Vielba *et al.*, 2011). En diferentes especies vegetales, otros genes *SCR* y *SCL* están también presente en órganos aéreos (Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sassa *et al.*, 2001; Morohashi *et al.*, 2003; Kamiya *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005) e implicados en el desarrollo de meristemos axilares (Schumacher *et al.*, 1999; Bolle, 2004). Estos datos soportan la hipótesis de que dichos genes participan en las divisiones celulares asimétricas y en el establecimiento del patrón radial de crecimiento del brote y de la raíz como por ejemplo el gen *BnSCL1* (Gao *et al.*, 2004).

El gen *SHR* es uno de los más estudiados en *Arabidopsis*, se le atribuyen diversas funciones en el desarrollo de la raíz y del sistema vascular, en el mantenimiento del centro quiescente, en la regulación del patrón radial de la raíz, el desarrollo de RLs y RAs y en las divisiones asimétricas de las células iniciales del córtex y la endodermis (Yu *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2011; Hao y Cui, 2012; Koizumi *et al.*, 2012a). En *Populus* se han caracterizado tres genes *SHR* diferentes que incrementan los niveles de expresión a lo largo del desarrollo radicular y que presentan niveles bajos de expresión en tallos y hojas a excepción del *PeSHR2*, que de forma similar al *CsSHR2* presenta niveles de expresión elevados en los tallos (Xuan *et al.*, 2014). Como es característico de la familia GRAS, estas proteínas *SHR* se localizan en el núcleo a excepción de *PeSHR3* que es una proteína citosólica. Esto indica que aunque existen aspectos conservados en las diferentes especies también existen aspectos divergentes al incrementarse el número de genes pertenecientes a esta familia. En *Medicago truncatula*, *MtSHR1* muestra mayores niveles de expresión en el ápice de la raíz que en las hojas y en la zona de elongación de la raíz (Imin *et al.*, 2007). En *Pinus radiata* se caracterizó un gen *PrSHR* que presenta bajo porcentaje de identidad con los dos genes caracterizados en castaño, se expresa mayoritariamente en raíces en comparación con los cotiledones, el ápice del brote y los hipocótilos (Solé *et al.*, 2008). La expresión de este gen se asocia con diversos órganos con meristemos en proliferación y células en división activa. Por todo ello, no podemos concluir si los genes *CsSHR1* y *CsSHR2* son ortólogos del gen *PrSHR*. En el caso del gen *CsSHR2*, la elevada expresión en ápices y yemas, sugiere que esté involucrado en el desarrollo de meristemos apicales y axilares. Su elevado nivel de



expresión en entrenudos, pudiera estar relacionado con desarrollo vascular y la xilogenesis (Wang *et al.*, 2011; Della Rovere *et al.*, 2015)

Finalmente, el análisis del gen *CsRLK*, que codifica una proteína con los dominios propios de las del grupo LRR-RLKs (“Leucine rich repeat Receptor-like protein Kinase”), mostró que los niveles de expresión en general fueron más elevados en las partes aéreas del brote que en la raíz. Dentro del grupo de genes LRR-RLKs se encuentran los genes SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), siendo el primero aislado en cultivos embriogénicos y considerado como un marcador de la adquisición de la capacidad embriogénica (Schmidt *et al.*, 1997). En *Cyclamen persicum* Mill, también se ha descrito la participación de genes de esta familia en la organogénesis de brotes y raíces con un nivel elevado de expresión en ambos tipos de primordios (Savona *et al.*, 2012). El gen *MtSERK1*, marcador de la ES, también se induce su expresión durante la organogénesis de raíces a partir de callo, y se cree que pueda tener un papel más amplio en la morfogénesis (Nolan *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2006). Posteriormente, su expresión también se asoció con meristemos primarios del brote y de la raíz y a células procambiales del tejido vascular, por lo tanto relacionada con eventos de reprogramación celular (Nolan *et al.*, 2009), como es el caso del EA. Emparentado con esta familia génica se encuentra el gen *CsRLK*, con abundante expresión también en los entrenudos que podría estar relacionada con formación de tejido vascular. A pesar de su bajo nivel de expresión en la raíz, incluido el ápice radicular, no se descarta su posible implicación en procesos asociados a un pequeño número de células madre en el ápice de la raíz, o de células cambiales que pudieran activarse durante el EA. Dentro de los genes *Clavata*, de la familia LRR-RLK, *Clavata 3* regula negativamente la expresión del gen *Wuschel* y entre los dos controlan la organización del meristemo apical. Otro de los genes de esta familia, *Clv1-like* muestra niveles de expresión más elevados en las raíces y primordios radiculares que en los tejidos aéreos de *Pinus sylvestris* (Heller *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* se evaluó el patrón de expresión de 223 *LRR-RLK* mostrando todo tipo de especificidades de tejidos (Wu *et al.*, 2015). Por todo ello, es necesario evaluar otros aspectos del patrón de expresión génica del gen *CsRLK*, para poder precisar su posible implicación además de en el desarrollo de yemas y merisemos apicales, en el EA y/o desarrollo de la raíz.

Los elevados niveles de expresión de algunos genes en las yemas axilares u otros órganos fotosintéticos, podría dificultar el análisis de la expresión de genes implicados en la inducción del enraizamiento cuando empleamos el sistema de brotes. En general en nuestro estudio, las hojas presentan niveles de expresión relativamente bajos, por lo cual como ya se ha

mencionado el sistema de hojas resulta apropiado para la caracterización de genes de respuesta a auxina.

## 4.2. EL ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO

### 4.2.1. El nicho de células competentes para el enraizamiento adventicio en castaño y el desarrollo radicular

El estudio llevado a cabo en el sistema experimental de hojas ha permitido hacer una evaluación histológica de cómo tiene lugar el proceso de la formación de las RAs. Los resultados mostraron que aunque se utilicen explantos diferentes el desarrollo de las raíces es similar en brotes y hojas, involucrando los mismos tipos celulares y tejidos, por lo que la inducción y la regulación del proceso podrían tener lugar de la misma manera en ambos casos. De acuerdo con la bibliografía y aunque existe algo de controversia sobre cuáles son las células competentes para la formación de RAs, en general estas se originan a partir del cilindro vascular (de Klerk *et al.*, 1999; Abarca y Díaz-Sala, 2009). Más concretamente son las que las células de zonas cercanas al cambium y floema las que se desdiferencian dando lugar a la iniciación de la raíz (Hamann, 1998; Vidal *et al.*, 2003; Naija *et al.*, 2008) o en especies como *Pinus tadea* (Hutchison *et al.*, 1999), *Nicotiana tabacum* (Altamura *et al.*, 1991), *Brassica oleracea* (Zhu *et al.*, 2010) y *Rhododendron* (Dokane *et al.*, 2014), las células del cambium son las que experimentan las primeras divisiones celulares que darán lugar a los primordios de raíz. Salvo excepciones como por ejemplo en estaquillas de cacahuete donde se originan normalmente a partir de células epidérmicas (Atreya *et al.*, 1984).

El estudio histológico y anatómico realizado durante la inducción de raíces en hojas, muestra que estas se inician en la base del peciolo, cerca de la zona de corte y en regiones próximas al tejido vascular; ocasionalmente se observó la formación de raíces a partir del limbo de la hoja, pero siempre asociadas con alguna de las venas. Sin embargo en el sistema descrito por Rose *et al.* (2006), las raíces se originaban siempre en el peciolo y aunque las células del mesófilo también proliferaban, podían formar callo pero a partir de ellas nunca se formaban raíces. En castaño también se observó la proliferación y desorganización de las células corticales del peciolo en respuesta al tratamiento auxínico y en ausencia del desarrollo de los primordios (Fig. 17 A y B). En la inducción del enraizamiento en hojas de *Arabidopsis* mediante cultivo hidropónico, estas siempre se inician en el área del peciolo (Correa *et al.*, 2012). Un origen similar a partir de las células procambiales del tejido vascular y alrededor de la vena central fue descrito en *Labisia pumila var. alata* (Ling *et al.*, 2013); *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 2014) y *Beta vulgaris L.* (Gürel y Wren, 1995). En el caso de los

fragmentos de hojas de *Medicago trunculata*, las células de tipo procambial derivadas de las células próximas al floema son las que actúan como células madre pluripotentes, que dan lugar a los primordios en respuesta al tratamiento auxínico (Rose *et al.*, 2006; Imin *et al.*, 2007). En el sistema de enraizamiento desarrollado a partir de cotiledones de castaño, los grupos de células meristemáticas que darán lugar a las raíces, se forman a partir de la diferenciación y división de células de parénquima, localizadas cerca de tejidos prevasculares o tejidos vasculares diferenciados de los peciolos que se desarrollan en los cotiledones (Giovanelli y Rinaldi, 2009). En otros sistemas experimentales, como el “thin cell layers” de *Arabidopsis*, las raíces se originaron siempre en la endodermis, la capa celular que rodea al tejido vascular (Falasca *et al.*, 2004).

En el sistema de hojas de castaño, una vez iniciada la formación del primordio radicular, el proceso continua a través de etapas similares a las previamente descritas en el caso de los brotes de castaño (Ballester *et al.*, 1999) y de otras especies. En brotes de castaño *in vitro*, las primeras divisiones celulares que darán lugar a la formación de raíces fueron observadas en el cambium, a las 48-72 horas tras el tratamiento con auxina (Ballester *et al.*, 1999), sin embargo en hojas hemos localizado divisiones asimétricas a las 24 horas, que podrían ser la divisiones iniciales de primordios de raíz. Por tanto, en castaño el nicho de células competentes para el enraizamiento es el mismo independientemente del explanto empleado, asociado al tejido vascular y a las células del cambium y del mismo modo el proceso de desarrollo sigue las mismas etapas en brotes y hojas.

#### **4.2.2. Respuesta génica a la señalización de auxina durante el enraizamiento de material juvenil y adulto**

El estudio del patrón de expresión de estos genes en el material juvenil y adulto en respuesta al tratamiento auxínico, muestra que existen grandes diferencias en la regulación de la transcripción y en la regulación de la vía de señalización auxínica en función del estado ontogenético del material. La expresión de los genes *CsSCL1*, *CsGH3.2*, *CsENOD93* y *CsSHR2* en respuesta a la auxina es diferente en cada una de las líneas, bien por inducirse solo en una de las líneas o por mostrar diferencias cuantitativas entre ellas. Además, los niveles de expresión están directamente correlacionados con la capacidad de enraizamiento. En el material adulto, la respuesta de estos genes a la auxina estará asociada a su participación en otros procesos fisiológicos, o bien a una falta de plasticidad celular para responder al estímulo auxínico y desencadenar el proceso rizogénico. Por el contrario, en la línea juvenil los cambios transcripcionales detectados están asociados a la inducción del enraizamiento. Dado

que dichos cambios tienen lugar en las primeras 24 horas tras la aplicación de la auxina, estos genes podrían estar asociados al proceso de desdiferenciación y adquisición de un nuevo destino celular, previos a las primeras divisiones que darán lugar a la formación de primordios (Gahan, 2007; Li *et al.*, 2009; Legué *et al.*, 2014). Los genes *CsRLK*, *CsSCL3* y *CsSHR1*, no muestran un patrón de expresión diferente en función del estado ontogenético ni en respuesta al tratamiento con AIB. Finalmente el gen *CsUGT*, también está regulado por el estado ontogenético del material, aunque en ambos materiales se inhibe por auxina, esta inhibición tiene lugar antes en el material adulto. Este gen es el único que ve reprimida su expresión por la vía de señalización auxínica.

Por otra parte, la observación de que la aplicación de NPA reprime el efecto inductor o represor del AIB en los niveles de transcrito de los genes *CsERF1*, *CsSCL1*, *CsGH3.2*, *CsSHR2*, *CsENOD93* y *CsUGT* del material juvenil confirma la participación de estos genes en las rutas de señalización auxínica. Estos resultados no excluyen un posible papel del resto de genes evaluados en la inducción del proceso de EA, ya que la modificación de la expresión no tiene por qué ser cuantitativa, cambios cualitativos en la localización del transcrito o una posterior regulación postranscripcional también pueden determinar su participación en la inducción del enraizamiento. Los niveles de expresión en hojas en ausencia de la aplicación exógena de auxinas representan los niveles basales o generados por el contenido en auxinas endógenas en respuesta al efecto de corte. En las primeras 24 horas tras la escisión del brote las células adquieren un estado transitorio de mayor sensibilidad a las auxinas y citoquininas lo que hace que se induzca o reprima el enraizamiento (de Klerk *et al.*, 1999)

El análisis más en detalle de la expresión de los genes *CsERF1*, *CsSCL1*, *CsGH3.1* y *CsRLK*, mostró una relación directa entre la respuesta rizogénica y la localización de los transcritos de *CsERF1* y *CsSCL1* asociada a la inducción e iniciación del EA, y de los cuatro genes asociados a la organización del meristemo de radicular y al desarrollo de la raíz.

La inducción puntual del gen *CsERF1* por auxina a las 12 horas en los brotes que enraízan, aunque no es muy elevada, es contrarrestada en ese momento por la aplicación de NPA, a valores similares al de las muestras control. A pesar de que el incremento de los niveles de expresión no es muy elevado, en otros factores de transcripción como el gen *AtSCL14*, se ha mostrado que un incremento de 1,4 veces en su expresión promueve la expresión de los genes diana (Fode *et al.*, 2008). Este gen es activado por ARFs y actúa sobre la ruta de señalización de las citoquininas inhibiéndola para promover el desarrollo de las RAs. Durante la inducción del EA en *Vigna radiata*, también se mostró la inducción temprana

por auxina (6 h) de un gen de la familia AP2-ERF, mientras que en otros cinco genes de esta familia disminuyó su expresión a las 24 horas con respecto a los controles (Li *et al.*, 2016). En el caso del gen *PtAIL1*, actúa como un regulador positivo en etapas tempranas de la formación de raíces, ya que su sobreexpresión incrementó el número de RAs (Rigal *et al.*, 2012). Este gen modula la expresión de las Ciclinas tipo D (Karlberg *et al.*, 2011) y por lo tanto podría estar regulando a través de las ciclinas las divisiones celulares y la diferenciación celular. Otro gen de esta familia inducible por auxina, *PtaERF003* participa en la transducción de la señal auxínica y promueve la formación de RAs y RLs (Trupiano *et al.*, 2013). Entre los genes de respuesta a etileno, inducibles por auxina encontramos también el gen *CRL5*, que promueve el EA reprimiendo la señal de las citoquininas (Kitomi *et al.*, 2011).

La distribución asimétrica y localización preferencial en las células del cambium, del gen *CsERF1* a las 12 horas tras la inducción del enraizamiento establece una relación directa entre la activación y adquisición del destino celular en la formación de RAs y la expresión génica. Su localización durante el desarrollo de los primordios en las células periféricas del primordio y en las células iniciales del córtex y la endodermis, que se mantiene, en el ápice de la raíz desarrollada (Fig. 25 y 26), apoya su posible participación en el control de la organización del meristemo. Factores de transcripción de la familia AP2/ERF (PLETHORA1, PLETHORA2 y BABY BOOM1) también son inducidos por auxinas e inhibidos por citoquininas y están implicados, en la formación de los nichos de células madre de raíz en *Medicago trunculata* (Imin *et al.*, 2007). Otros genes de esta familia, también son inducibles por auxina mediante la regulación de las proteínas ARFs, como el gen PUCHI que influye en el patrón de división celular en las etapas iniciales de desarrollo de RLs. Este gen restringe su expresión a regiones con células en proliferación, sin embargo en las etapas iniciales de desarrollo de las RLs, la expresión se localiza en el meristemoide pero a medida que avanza el desarrollo, la expresión se focaliza en la base del primordio y no en el ápice meristemático y está ausente en el ápice radicular (Hirota *et al.*, 2007). Los genes *PLT1* y *PLT2* focalizan la expresión en el CQ y las células que lo rodean, por lo que se le atribuye el mantenimiento de las células madre y de la identidad del CQ (Aida *et al.*, 2004). El patrón de expresión de esta familia génica puede asociarse a tres funciones principalmente dependiendo de los niveles de transcripción; niveles altos promueven el mantenimiento de la identidad de células madre, niveles menores promueven las divisiones asimétricas de las células meristemáticas y los niveles más bajos son requeridos para la diferenciación celular (Galinha *et al.*, 2007). El patrón de expresión del gen *CsERF1* nos sugiere que está implicado en la regulación de las divisiones asimétricas celulares, que tienen lugar en el cambium para iniciar el desarrollo del primordio y a lo largo



de su desarrollo se focaliza en la región que dará lugar a la caliptra y la epidermis y en las células iniciales del córtex y las endodermis, al igual que en el ápice radicular. Al regular las divisiones asimétricas, dirige el crecimiento de la raíz manteniendo el patrón radial celular característico.

A pesar de tratarse de genes de respuesta a etileno, trabajos previos realizados en otros procesos muestran que la regulación transcripcional de estos genes puede verse controlada por diversas hormonas (auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas y ABA) y otros estímulos debido a su papel en la respuesta a estreses bióticos y abióticos, así como en procesos de senescencia y maduración del fruto (Sakuma *et al.*, 2006; El-Sharkawy *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010; Tacken *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Sherif *et al.*, 2012). El desarrollo y maduración del fruto, proceso que al igual que el EA está altamente dirigido por hormonas y pueden ser regulados por etileno, por auxina o por ambos (El-Sharkawy *et al.*, 2009). En respuesta a diversos estreses el gen *NtCEF1* actúa irrumpiendo la homeostasis de auxinas y citoquininas (Lee *et al.*, 2005). Además la aplicación de auxinas indujo la expresión de la mayoría de los *ERFs* evaluados en petunia entre las 6 y 24 horas (Liu *et al.*, 2011), siendo el AIA el que produjo el mayor cambio en el patrón de transcripción. Cabe mencionar el gen *MtSERF*, implicado en la biosíntesis de etileno y que parece ser esencial en la inducción de la ES (Mantiri *et al.*, 2008), proceso que también requiere una etapa de desdiferenciación y reprogramación celular, al igual que el EA. El gen *CsERF1* está regulado por la vía auxínica pero no podemos descartar que exista corregulación por el etileno. Como otros genes de esta familia, el *CsERF1* parece ser requerido en las primeras etapas de procesos morfogénicos (Hirota *et al.*, 2007) o en la adquisición un estado meristemático o competente para la división de células (Nole-Wilson *et al.*, 2005). En el desarrollo de los primordios y crecimiento radicular podría estar implicado en dirigir las divisiones asimétricas celulares que determinan el patrón radial de la raíz y dirigen el crecimiento y desarrollo de los diferentes tejidos (Aida *et al.*, 2004 y revisado en Vernoux y Benfey, 2005; Legué *et al.*, 2014)

El patrón de expresión espacio-temporal del gen *CsSCL1* durante la inducción del EA en hojas, corrobora su papel en etapas tempranas del proceso al igual que ocurría en los brotes (Sánchez *et al.*, 2007; Vielba *et al.*, 2011). La diferente respuesta a la auxina del material adulto en hojas y brotes de castaño, indica que la expresión está regulada de forma diferente en los distintos órganos y que la inducción auxínica observada también en brotes adultos puede venir determinada por diversos procesos que tienen lugar de forma simultánea. Una expresión órgano-dependiente también se ha descrito en el caso del gen *BnSCL1*, el cual se induce con la aplicación exógena de auxinas en la raíz y se reprime en el brote, sin embargo la



aplicación de NPA no afectó al patrón de expresión génica en ninguno de los dos casos (Gao *et al.*, 2004). En el caso del gen *CsSCL1*, hay que tener en cuenta que la concentración de auxina utilizada en ambos sistemas fue diferente, mucho más elevada en el caso de los brotes, lo cual puede también estar afectando a los niveles de inducción. El retraso en el pico de inducción observado en hojas (24h) con respecto al de brotes (12h) puede ser también consecuencia del diferente tratamiento auxínico, menos concentrado y durante un período de tiempo más largo en el caso de las hojas. Por otra parte, la mayor inducción relativa detectada en hojas que en brotes, posiblemente esté relacionada con los bajos niveles de expresión basal del gen en las hojas, y a la exclusión de otros órganos como las yemas y procesos que puedan estar afectando la ruta de señalización de auxina en los brotes. El gen ortólogo en pino, *PrSCL1* inducible también por auxina, mostró un patrón de expresión ligeramente diferente al de castaño, pero asociado a la capacidad y al proceso de enraizamiento (Sánchez *et al.*, 2007).

La regulación por la auxina de *CsSCL1* en función del estado ontogenético también fue corroborada mediante la localización específica de los transcritos en las células del cambium involucradas con la iniciación de la raíz (Fig. 43), únicamente en las hojas competentes para. De forma similar, la expresión del gen *WOX11*, se localizó asociada al procambium de las hojas o a las células del parénquima próximas al procambium que darán lugar a las células iniciales de raíz (Liu *et al.*, 2014a). En el caso del gen *PrSHR* de *Pinus radiata*, no inducible por auxina, su expresión se focaliza en las células del cambium (Solé *et al.*, 2008). Como ya se argumentó en el trabajo de Vielba *et al.* (2011), el análisis histológico de los explantos con alta y baja capacidad de enraizamiento ha mostrado que las células de los explantos que no enraízan también son sensibles al tratamiento auxínico, presentan señal leve y difusa y responden en términos de división y proliferación celular, dando lugar a la formación de callo, pero no se produce la reorganización celular requerida para la formación del primordio radicular (Díaz-Sala *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999). Todo esto apoya la hipótesis de que la pérdida de capacidad rizogénica con la maduración es en gran parte debida a la incapacidad de las células de los tejidos adultos para adquirir el nuevo destino celular que permite la formación de RAs, se han bloqueado ciertas vías de respuesta a auxina y la homeostasis auxínica que permite establecer el gradiente hormonal necesario para desencadenar el proceso de EA (Vidal, 2002). Además, el efecto inhibitor del NPA en la iniciación del enraizamiento está correlacionado con la reducción de los niveles de expresión del gen *CsSCL1* a las 24 horas. El NPA también generó pequeñas diferencias en la morfología de la raíz, así como cambios en el patrón de expresión espacial del gen durante el desarrollo de los primordios, dependiendo del momento de aplicación del mismo. Teniendo en cuenta que la aplicación

simultánea de AIB y NPA redujo severamente la iniciación de primordios, la evaluación histológica realizada a los 10 días tras iniciar el proceso, mostró diferencias más acusadas cuando el NPA se aplicó después del tratamiento con AIB, con una reducción en los niveles del transcrito en el primordio incipiente, apenas desarrollado debido al bloqueo ejercido por el NPA en su desarrollo. Sin embargo, durante la aplicación simultánea de AIB y NPA, los pocos primordios desarrollados, fueron capaces de retomar su crecimiento de forma casi normal tras la retirada del NPA. El desarrollo de los primordios depende de la reespecificación de células somáticas iniciales, el establecimiento del patrón radicular y la polaridad y la especificación del meristemo radicular. Para que esto tenga lugar es fundamental que se establezca el gradiente auxínico, por lo que cuando aplicamos NPA se altera el desarrollo normal del primordio, (Greenwood *et al.*, 2001; Overvoorde *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, el NPA inhibió el desarrollo radicular provocando también un engrosamiento del ápice de la raíz (Ruegger *et al.*, 1997). En *Pinus sylvestris* indujo cambios en su sistema radicular así como en el patrón de expresión del gen *SCR* en el ápice de la raíz (Laajanen *et al.*, 2007). El NPA estimula la formación de callo y retrasa la organización del meristemo (Greenwood *et al.*, 2001). En petunia el NPA también retrasó el desarrollo de los primordios radiculares y provocó una supresión del pico de AIA detectado a las 24 horas en muestras no tratadas con NPA, permitiendo correlacionarlo con la inhibición del EA (Ahkami *et al.*, 2013). Esta correlación del contenido de auxinas con los tejidos competentes y con el enraizamiento ha sido apoyada por otros trabajos (Dong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014a; de Almeida *et al.*, 2015).

Todo ello confirma el papel de *CsSCL1* en el EA, y el efecto del NPA alterando el transporte de auxinas, de forma que probablemente impide la creación de puntos máximos de auxinas y el establecimiento del gradiente necesario para la iniciación y el desarrollo de los primordios radiculares.

En los primordios, el gen *CsSCL1* muestra una expresión muy patente en todo el meristemo pero mayor en la protodermis y células iniciales del córtex y la endodermis. La localización del transcrito del gen *CsSCL1* en el CQ de las raíces y en las células iniciales del córtex y de la endodermis, sugiere que el gen está involucrado en el mantenimiento del patrón radial de desarrollo de la raíz y en mantenimiento del CQ. Esto se ve apoyado por la ausencia de columela incipiente en los primordios desarrollados al aplicar AIB y NPA simultáneamente. Otros genes de la familia GRAS, como *SHR* y *SCR* se sabe que desempeñan un papel regulador en la organización de la raíz y mantenimiento del meristemo (Helariutta *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003;

Sbabou *et al.*, 2010; Wiśniewska *et al.*, 2013; Koizumi y Gallagher, 2013). Como se propuso para los genes *PLT* anteriormente y para el gen *SHR* (Galinha *et al.*, 2007; Koizumi *et al.*, 2012b), en función de los niveles de transcrito, el gen *CsSCL1* podría estar involucrado en la regulación de la iniciación, crecimiento y desarrollo de RAs. Niveles más altos de transcrito parecen estar asociados a células en división activa del meristemo apical, se asocian a tejidos que están sufriendo divisiones asimétricas o tejidos en proliferación, también participaría en la adquisición de totipotencia celular en las células progenitoras y con niveles más bajos participan en el mantenimiento del CQ. La expresión del gen *CsSCL1* durante el desarrollo de los primordios de RAs y RLs y en el CQ del ápice de la raíz confirma su papel en el mantenimiento del patrón radial de las células de la raíz. La expresión de *CsSCL1* en las yemas axilares apoya su posible implicación en el mantenimiento de meristemas como fue sugerido por Vielba *et al.* (2011).

La expresión localizada de estos genes, en el cambium y divisiones asimétricas, sugiere que participan en la adquisición de las células de su nuevo destino celular hacia células iniciales de raíz. Las células somáticas cambian el patrón típico de expresión génica, para dirigir el nuevo proceso de desarrollo (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003; Terranova *et al.*, 2006). Los genes *CsSCL1* y *CsERF1* podrían ser candidatos para promover la pluripotencialidad de las células como WUS (Gallois, 2004), cuya expresión ectópica en el ápice de la raíz induce la adquisición de células madre de brote y la iniciación de la formación de yemas adventicias, desarrollo ectópico de hojas, ES o tejidos florales. Las divisiones celulares asimétricas son uno de los principales mecanismos para la diversificación de las células, adquiriendo funciones y facetas diferentes (Kamiya *et al.*, 2003).

Al igual que el gen *CsSCL1*, el gen ***CsENOD93*** está regulado por auxina en función del estado ontogenético del material (solo en juvenil). Su patrón de expresión lo correlaciona directamente con la capacidad rizogénica del material, por lo que parece participar en el EA, además de otros procesos propios de genes de esta familia génica como es la nodulación. Su inducción temprana por la auxina, sugiere que también podría estar implicado en la dediferenciación celular, adquisición de competencia y del nuevo destino celular. Un comportamiento similar se observó en el gen *5NG4* que codifica una nodulina de *Pinus tadea* L cuya expresión diferencial en estaquillas juveniles y adultas la correlaciona con el EA (Busov *et al.*, 2004), al igual que la *Nodulin21-like* de *Pinus sylvestris* que presentan una respuesta al AIB y a inhibidores del transporte polar de auxinas similar a la de *CsENOD93* (Heller *et al.*, 2012).

El gen *GmENOD93*, altamente homólogo a *CsENOD93* se expresa en los meristemos primarios de los nódulos y en la región meristemática de los nódulos en desarrollo, pero dado que su inducción ocurre tras el comienzo de la fijación del nitrógeno, su expresión no puede asociarse con la actividad meristemática de las células (Kouchi y Hata, 1993). Otro gen homólogo a *CsENOD93*, el *OsENod93a* de arroz, se induce en respuesta a la infección bacteriana, y su mayor expresión en los cultivos celulares en suspensión sugiere que tiene un papel en los tejidos indiferenciados (Reddy *et al.*, 1998). El patrón de expresión de *OsENOD93-1*, está asociado con la emergencia y maduración de las raíces (Bi *et al.*, 2009). En resumen, el gen *CsENOD93* parece participar en las etapas tempranas del desarrollo de RAs, sería interesante evaluar su patrón de expresión *in situ* para confirmar si al igual que otros genes homólogos se localiza en tejidos específicos.

*CsENOD93*, es inhibido por la aplicación de NPA. Los procesos organogénicos de la planta y el proceso de nodulación están dirigidos por el balance entre auxinas y citoquininas. A diferencia del EA, la nodulación puede inducirse por la aplicación de citoquininas o inhibidores del transporte polar de auxinas (NPA o TIBA) (Miklashevichs *et al.*, 2001). Incluso la aplicación de NPA induce la formación de pseudonódulos en ausencia de infección (Wu *et al.*, 1996) induciendo la expresión de diversos genes de la familia de las nodulinas tempranas como los genes *ENod2*, *ENod8*, *ENod12* y *ENod40* (Miklashevichs *et al.*, 2001).

Se han identificado diversos genes de esta familia también en especies no leguminosas, pero de la mayoría de ellos no se conoce su función, únicamente se ha descrito su dinámica de expresión (Gamas *et al.*, 1996). Uno de los más estudiados es el *ENOD40*, al que se le atribuyen diversas funciones, como la división de las células corticales y la desdiferenciación celular en las primera etapas del desarrollo de los nódulos (Charon *et al.*, 1997), la diferenciación de los haces vasculares (Kouchi *et al.*, 1999) y otras aún menos relacionadas con el enraizamiento como el transporte de productos fotosintéticos. Sin embargo en *Phaseolus* este gen participa en las primeras etapas del desarrollo de RLs y en la división de las células del periciclo para el desarrollo del primordio radicular (Papadopoulou *et al.*, 1996). Estos resultados relacionan las nodulinas con otros procesos organogénicos independientes de la nodulación. Se cree *ENOD40* podría estar implicado en el estado hormonal de la planta y que su expresión depende de cambios hormonales como por ejemplo el incremento de la concentración de auxinas que genera el desarrollo de RLs. Además podría considerarse como uno de los genes marcadores de la iniciación de las RLs cuya expresión se localiza en los tejidos meristemáticos de los primordios foliares y de RLs (Papadopoulou *et al.*, 1996).

El proceso de nodulación, es otro proceso organogénico que está regulado por diversas familias de factores de transcripción también descritas en el proceso de EA como la familia GRAS y AP2/ERF (Libault *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2015). Por ejemplo, ciertas proteínas GRAS participan en la señalización de los factores de nodulación y en la morfogénesis de los nódulos a través de la activación de *ENOD11* (Sun *et al.*, 2011). Por ello sería interesante evaluar si *CsENOD93* es uno de los posibles genes diana que está regulado por los factores de transcripción de la familia GRAS y AP2/ERF.

El gen *CsGH3.2*, es inducible por auxina en ambas líneas, pero la inducción es mucho mayor en el material competente para enraizar por lo que su expresión también está regulada por el estado ontogenético. La inhibición de la inducción auxínica, en términos de expresión génica, generada por la aplicación de NPA confirma su papel en la ruta de señalización auxínica.

Los genes de la familia GH3 están implicados en la homeostasis de auxinas regulando los niveles de auxina libre y activa, actúan mediante la conjugación de AIA con aminoácidos. La familia GH3 participa en la transducción de la señal auxínica, incrementa rápidamente los niveles de transcripción (Hagen y Guilfoyle, 1985) con el incremento de la concentración auxínica para poder formar conjugados y modular su actividad, de esta manera ejerce un efecto represor de la señal auxínica (Rozov *et al.*, 2013). Su expresión está controlada por los ARF (Guilfoyle y Hagen, 2007). Aunque esta regulación es aún más compleja, interviniendo otros compuestos como el etileno. Al evaluar genes de esta familia, como el *VvGH3.1*, se demostró que era necesario un incremento de los niveles de etileno para que las auxinas indujeran su expresión (Böttcher *et al.*, 2012). En el proceso de EA ya se ha descrito que junto al incremento de auxinas tiene que existir un incremento de los niveles de etileno que fomente la sensibilidad tisular a las auxinas y su respuesta fisiológica (Liu *et al.*, 2005) por lo que no debemos descartar la posible regulación del gen *CsGH3.2* por el etileno. Los diferentes niveles del transcrito *CsGH3.2* en las dos líneas de castaño, podrían estar relacionados con diferencias en la actividad enzimática para formar conjugados o para establecer el gradiente apropiado de auxina en el caso del material juvenil. En eucalipto, se han evidenciado diferencias en el metabolismo de AIA y formación de conjugados entre genotipos con alta y baja capacidad de enraizamiento (Negishi *et al.*, 2014).

Genes de esta familia son considerados como marcadores de respuesta temprana auxina, como el *NtGH3*, con un pico de expresión transitorio a las 6 horas tras el tratamiento con ANA (Roux y Perrot-Rechenmann, 1997). Durante la inducción del EA en hipocótilos de



*Arabidopsis*, se incrementaron los niveles de *GH3-2* en respuesta al corte, coincidiendo con el incremento de AIA endógeno, mientras que la aplicación de NPA en el ápice decapitado inhibía el EA (Sukumar *et al.*, 2013). Los genes *GH3-3*, *GH3-5* y *GH3-6* también están correlacionados con el EA (Sorin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Otros genes de esta familia, participan en el crecimiento y desarrollo de la raíz (Khan y Stone, 2007) y de RLs (Fu *et al.*, 2011). El *GH3.14* se sobreexpresa tras la aplicación de auxinas pero exclusivamente en las raíces, sin embargo este gen pertenece al grupo III y no se conoce su función (Paponov *et al.*, 2008). En el caso del *GH3.5* de *Arabidopsis*, se induce tras la aplicación de diferentes hormonas, AIA, ABA, AG3, kinetina, ácido jasmónico y metil-jasmonato, sin embargo no responde al ácido salicílico, lo cual sugiere que la actividad de los *GH3* puede ser distinta en diferentes procesos fisiológicos en función del balance hormonal (Ostrowski y Jakubowska, 2013).

Dado que *CsGH3.2* es inducido por auxina y está implicado en su homeostasis, la abundancia de transcrito debería coincidir con la acumulación de auxinas, sin embargo *CsGH3.2* se localizó en tejidos específicos de los primordios. En el desarrollo de los primordios de RLs, la concentración de auxinas se distribuye formando un gradiente que alcanza la concentración máxima en el punto más apical (Benková *et al.*, 2003), sin embargo la localización específica de *GH3.2* de arroz indica que aunque la presencia de auxinas puede modificar sus niveles de expresión su distribución es dependiente del tipo de tejido (Fu *et al.*, 2011). La distribución celular del transcrito *CsGH3.2* en las células iniciales del córtex y de la endodermis, podría indicar su papel en la regulación de las divisiones asimétricas de las células.

Por otra parte, los elevados niveles del mensajero *CsGH3.2* en el meristemo apical, primordios foliares y yemas axilares corresponden a zonas de síntesis activa de auxinas ya que aunque la síntesis *de novo* de auxinas puede tener lugar en diferentes órganos son los tejidos apicales jóvenes la principal fuente de AIA (Ljung *et al.*, 2001; Friml y Palme, 2002; Friml, 2003).

Dentro de los genes SHR identificados en castaño, el gen ***CsSHR1*** no está regulado por auxina ni muestra variaciones de expresión entre las dos líneas, aunque parece que el material adulto presenta más inestabilidad en los niveles de transcrito. Estas modificaciones en la expresión génica pueden ser críticas en la iniciación o capacidad de EA. Por el contrario, ***CsSHR2*** muestra diferencias de expresión dependientes del estado ontogenético tanto en respuesta al efecto de corte como en respuesta a la auxina. En la literatura encontramos que la



ruta de señalización auxínica no induce la expresión de este gen en diversas especies como *Medicago truncatula* (Imin *et al.*, 2007) y *Pinus radiata* (Solé *et al.*, 2008). Algunos trabajos proponen la ruta de señalización de las giberelinas como posible modulador de su expresión (Koizumi *et al.*, 2012b) y asocian el gen *SHR* con la homeostasis de citoquininas (Cui *et al.*, 2011). En base a datos obtenidos en otras especies cabe esperar que ambos genes estén implicados en la inducción del EA, el *CsSHR2* porque podemos establecer una correlación directa entre los niveles de expresión, la respuesta rizogénica al tratamiento auxínico y la inhibición del transporte polar mediante NPA. El gen *CsSHR1* podría presentar un comportamiento similar al de otros *SHR* descritos no inducibles por auxina, pero con localización asociada a tejidos involucrados en la iniciación de raíces, como el gen *PrSHR* que se expresa en las células del cambium en respuesta al tratamiento con AIB sin modificar los niveles cuantitativos de transcrito (Solé *et al.*, 2008). En este sentido, es necesario profundizar más en el estudio de estos genes para poder establecer el papel concreto que están desempeñando. A pesar de que el gen *CsSHR1* no se ve afectado por la aplicación de auxina, su expresión parece estar modulada por el NPA, pero posiblemente no a través de la inhibición del TPA sino que por otros factores que se ven alterados. El análisis tampoco permite correlacionar el incremento de expresión generado por NPA con la respuesta rizogénica de los explantos.

Muchos trabajos han mostrado el papel del *SHR* en la inducción y desarrollo del EA, siendo esencial para la formación de RAs, ya que los mutantes deficientes en este gen ven reducida su capacidad rizogénica. El *SCR* afecta a la iniciación del EA y se supone que en esta etapa es activado por el *SHR*, siendo ambos necesarios para la adquisición de la identidad de las células iniciales del primordio radicular, de forma similar a lo que ocurre en la iniciación de las RLs (Lucas *et al.*, 2011; Della Rovere *et al.*, 2015). Al igual que en *Arabidopsis*, *PeSHR1* interacciona con el gen *PeSCR*, pero no existen estas interacciones con los genes *PeSHR2* y *PeSHR3* (Xuan *et al.*, 2014). En el desarrollo radicular, *SHR* regula las divisiones asimétricas de las células progenitoras del ápice radicular, y de las células iniciales del córtex y la endodermis y participa en la especificación de la endodermis en la raíz de *Arabidopsis* (Cui *et al.*, 2011). También en pino, la expresión de *PrSHR* en el meristemo radicular sugiere su participación en la organización y mantenimiento del meristemo (Solé *et al.*, 2008). Estos aspectos serán evaluados con más detalle en el apartado de *Populus*.

El gen *CsUGT* está regulado negativamente por la auxina, mientras que el NPA indujo su expresión a niveles superiores a los de las muestras control, aunque no significativamente. El estado ontogenético afectó al patrón de expresión generado por el efecto del corte, sin

embargo en ambas líneas el tratamiento auxínico inhibió la expresión durante las 24 horas evaluadas, manteniendo valores constantes. La inhibición generada por la auxina fue más acusada cuando los niveles basales eran mayores, a las 12 horas en los adultos y a las 24 en los juveniles.

En *Panax ginseng* Meyer, se han caracterizado ciertas UGTs del grupo A, involucrados en la defensa y metabolismo secundario ya que responden al tratamiento con metil-jasmonato en RAs y tejidos diferentes (Khorolragchaa *et al.*, 2014). La identificación del motivo AuxRe (GAGACA) en la región promotora de *CsUGT*, sugiere que se trata de un gen de respuesta a auxinas regulado por ARFs, en este caso reprimiendo su expresión (Teale *et al.*, 2006; Guilfoyle y Hagen, 2007). El análisis de homología indica que podría tratarse de una antocianidina-3-O-glucosido UGT, que regula los niveles de antocianos y flavonoides, lo que concuerda con la importancia de estos compuestos en la capacidad rizogénica. Se han descrito UGTs que participan en el desarrollo de las raíces, como *PsUGT1* que actúa sobre flavonoides como el kaempferol, un inhibidor del TPA, y la alteración de su expresión puede generar cambios en el desarrollo de la raíz (Woo *et al.*, 2007). La menor acumulación de antocianinas en el material adulto de hiedra, el cual no enraíza, está asociada a una pérdida de la actividad de la dihidroflavonol reductasa (Murray y Hackett, 1991). La acumulación de quercetin glucosidos, durante la fase de propagación de *Eucalyptus gunnii* Hook, en presencia de citoquininas promueve la sensibilidad al tratamiento de auxinas y la formación de RAs (Curir *et al.*, 1990). En castaño, se ha observado un descenso en el contenido en flavonoides en la línea P2Rb en las primeras 48 horas tras la inducción del enraizamiento (Fernández-Lorenzo *et al.*, 2005). De forma similar en nogal se observó que una alta capacidad rizogénica estaba asociada a un bajo contenido en flavonoides (Cheniany *et al.*, 2013). Sin embargo, el diferente patrón de expresión de *CsUGT*, en ambas líneas, no permite inferir una mayor actividad de la proteína en el material juvenil. Hay que tener en cuenta que cada UGT puede actuar sobre un tipo de flavonoide específico.

El gen *CsSCL3* no se vio afectado ni por el estado ontogenético del material ni por el tratamiento con AIB, sin embargo la aplicación de NPA incrementó los niveles de transcrito. Este gen pertenece al clado PAT1 que se considera una excepción en la familia GRAS. Los mutantes de estos genes no presentan un fenotipo aberrante en el sistema radicular y además parece que participan en la cascada de señalización de las giberelinas y no de las auxinas (Bolle *et al.*, 2000). En el análisis de homología, una de las secuencias próximas conocida como “chitin-inducible gibberellin-responsive”, indica que actúan en la ruta de señalización de las giberelinas y que podrían estar implicadas en el proceso de nodulación (Day *et al.*,

2003; Bolle, 2015). Otra de las principales funciones de esta familia de factores de transcripción, es la respuesta a estrés y defensa, procesos altamente controlados por el balance hormonal. En tomate se evaluaron genes de diversas subfamilias y al menos uno de los pertenecientes al grupo PAT mostró cambios significativos en las primeras etapas de respuesta a estrés y “wounding” (Mayrose *et al.*, 2006). Es necesario estudiar en más profundidad este gen para poder confirmar o descartar su papel en el EA; además sería interesante evaluar otros factores como la luz y las giberelinas para poder profundizar en sus vías de regulación.

Para finalizar evaluamos el gen **CsRLK** tanto en la inducción como en el desarrollo de los primordios. Ni el estado ontogenético del material ni el tratamiento con AIB y/o con NPA modificaron sus niveles de expresión al menos en las primeras 24 horas evaluadas, por lo que los datos del análisis no permiten establecer ninguna relación de este gen con el proceso de EA. Además no disponemos de información de su localización específica que pudiera establecer diferencias cualitativas entre ambos líneas. El gen *DgSERK* mostró unos resultados similares a *CsRLK* en la fase de inducción, no pudiendo detectarse su localización en los primeros 4 días tras la inducción por auxina, sin embargo en los embriones en desarrollo su expresión se localizó en el polo radicular (Somleva *et al.*, 2000). Sin embargo el estudio mediante hibridación *in situ*, confirmó la posible participación de *CsRLK* en el desarrollo de los primordios de RAs y RLs y en el ápice radicular. Las LRR-RLKs son proteínas transmembrana de las vías de transducción de la señal mediante la fosforilación enzimática. Debido al análisis de homología, esta proteína podría estar implicada en diversos procesos de desarrollo participando en el reconocimiento, la regulación de la división, expansión y diferenciación celular. Dentro de esta familia se incluyen proteínas ampliamente caracterizadas en el proceso de embriogénesis como las proteínas SERK y CLAVATA. El patrón de expresión de estos genes demuestra que juegan un papel importante en diversos procesos morfogénéticos (Nolan *et al.*, 2003). El análisis filogenético incluye a *CsRLK* en la subfamilia IV, clado relacionado con la regulación del crecimiento de meristemos. En *Populus trichocarpa* se han caracterizado 379 genes de esta familia, algunos de ellos implicados en el desarrollo y diferenciación de tejidos meristemáticos (Zan *et al.*, 2013). En *Cyclamen persicum*, el patrón de expresión de los genes *CpSERK1* y *CpSERK2* en diversos proceso organogénicos, mostró su localización en el ápice del brote, los primordios foliares, la iniciación de yemas axilares, en la túnica y el procambium. En las RAs la expresión se focaliza en el ápice y algunas células del periciclo, asociadas al procambium que darán lugar al cilindro vascular, la protodermis y a la iniciación de RLs (Savona *et al.*, 2012). El patrón de

expresión de *CsRLK*, similar al de estos genes, sugiere que podría considerarse como un marcador de pluripotencialidad celular que darán lugar a la ES, la organogénesis y la xilogénesis.

La expresión de *CsRLK* varía durante el desarrollo de la raíz, particularmente en la zona central del meristemo, con expresión predominante en las capas más externas del primordio, que darán lugar a la epidermis y caliptra. Sin embargo, en el ápice de la raíz, la expresión es relativamente abundante en todos los tejidos del meristemo. Estas proteínas participan en la respuesta celular a estímulos, se trata de quinasas capaces de fosforilar proteínas citoplasmáticas, activando y permitiendo que la célula entre en división. La expresión del *CsRLK* en tejidos meristemáticos de la raíz, el ápice caulinar, las yemas axilares y los primordios foliares (fig. 47) se ajusta a este papel del gen. Otros genes de esta familia desempeñan funciones similares en diversos procesos de crecimiento y desarrollo como el gen *CLV1* (Clark *et al.*, 1997). Las proteínas LRR-RLK regulan la actividad de WUS, que juega un papel esencial en el mantenimiento de las células en estado de proliferación (Mayer *et al.*, 1998; Gallois *et al.*, 2002; Gallois, 2004; Smertenko y Bozhkov, 2014). Dentro de esta familia, la subfamilia TMK regula el crecimiento de la planta mediante el control de la expansión y proliferación celular, participando en la ruta de señalización auxínica (Dai *et al.*, 2013). En conclusión a pesar de que no podemos confirmar el papel del gen *CsRLK* en las etapas iniciales del proceso de EA, este gen está participando en el desarrollo radicular en las células en estado activo de proliferación.

#### 4.2.3. Pérdida de capacidad rizogénica con la maduración

El análisis de expresión génica en las dos líneas de cultivo confirmó que, a excepción de los genes *CsRLK* y *CsSCL3*, la expresión de los otros genes evaluados durante la inducción del EA está regulada por el estado ontogenético del material. En la literatura encontramos evidencias de que la expresión diferencial de genes asociada con la edad del individuo se traduce en diferencias morfológicas y fisiológicas, por ejemplo la morfología de las hojas y su capacidad fotosintética. De esta forma se ha observado que el contenido en clorofila aumenta con la edad, sin embargo los genes de la familia cab, implicados en la actividad fotosintética, muestran niveles más altos en hojas de plantas juveniles que en las de plantas adultas (Hutchison *et al.*, 1990). Diversos trabajos han correlacionado las diferencias en el patrón de expresión de ciertos genes, en material con diferente estado de maduración, con su respuesta rizogénica. Las modificaciones asociadas al cambio de fase pueden generar cambios de carácter cuantitativo o cualitativo en la expresión génica. En peciolo de hojas de hiedra, el

gen *PRP* se expresa más abundantemente en el material adulto, y preferencialmente localizado en las células asociadas con la regeneración de raíces, estableciendo una relación negativa entre expresión y capacidad de enraizamiento (Sánchez *et al.*, 1995). Por otra parte, en *Pinus taeda* se observó un incremento en el nivel de expresión de expansinas asociado a la capacidad de enraizamiento de los hipocótilos (Hutchison *et al.*, 1999). Los tejidos con diferente estado de madurez generan una respuesta transcripcional diferente debido a la supresión de la expresión de genes necesarios para entrar en el patrón de desarrollo de la raíz, ya sea por la supresión de la expresión de los factores de transcripción o por la metilación de sus genes diana.

En especies forestales la pérdida de la capacidad rizogénica asociada a la maduración (Covelo *et al.*, 2009; Pijut *et al.*, 2011; Husen, 2012; Díaz-Sala, 2014) puede deberse al descenso en el contenido de auxinas endógenas y otros compuestos promotores del enraizamiento, a la acumulación de sustancias inhibitoras del proceso de enraizamiento o al descenso de la sensibilidad de los tejidos a las auxinas (Greenwood y Hutchison, 1993; Hackett y Murray, 1993; Husen y Pal, 2006). El cambio de fase también desencadena un cambio en el transporte y metabolismo de las auxinas, modificando su homeostasis y con ello la regulación transcripcional de sus vías de señalización. Todos estos cambios, condicionan la diferente respuesta del individuo a determinados estímulos (revisado en Abu-Abied *et al.*, 2012). Varios trabajos confirman que los procesos de desarrollo en respuesta al tratamiento auxínico varían con la edad del tejido (Correa *et al.*, 2012). En el material adulto de *Pisum sativum*, tiene lugar descenso del transporte de AIA a la base del brote y un cambio en las rutas de transporte y conjugación de auxinas que provoca una pérdida de la capacidad de enraizamiento (Rasmussen *et al.*, 2015).

Se ha observado que en las primeras etapas de inducción del EA las células del cambium sufren un incremento de los niveles de transcripción de genes específicos, esta modificación de la respuesta transcripcional solo ocurre en el material competente de enraizar, es decir esto no se observa en el material adulto (Solé *et al.*, 2008; Abarca y Díaz-Sala, 2009; Vielba *et al.*, 2011). La diferente localización del gen *CsSCL1* en cada una de las líneas de cultivo, sugiere que solo el material juvenil tienen la capacidad de reajustar su patrón de expresión, al menos el de los genes específicos para, adquirir el nuevo destino celular antes de comenzar a proliferar (Abarca y Díaz-Sala, 2009).

Aunque en este caso concreto, existe una correlación directa entre localización y activación celular para el EA, en otras ocasiones la relación puede ser inversa y su función sea



la de reprimir o inhibir las divisiones celulares iniciales que darán lugar a las raíces (Woo *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1995). Además, como ya se ha señalado anteriormente, la diferente regulación de la expresión en función del estado ontogenético también viene determinada por el órgano empleado y no es generalizada.

Finalmente, en el caso que nos ocupa, aunque no se han llevado a cabo estudios de metilación, todo indica que las modificaciones en los patrones de expresión detectados entre el material juvenil y adulto sometidos a los mismos tratamientos, son atribuidos las modificaciones epigenéticas generadas durante la maduración. El grado de metilación del ADN de los tejidos meristemáticos, es una marca de capacidad morfogenética (Fraga *et al.*, 2002; Valledor *et al.*, 2010). En castaño, la edad está correlacionada con el incremento en la metilación de 5-deoxicitidinas (Hasbún *et al.*, 2005). Por otro lado, la modificación del patrón de metilación de histonas influye en la capacidad de respuesta a estímulos y de coordinar la expresión génica, las cuales son diferentes en función del tipo celular (Pfluger y Wagner, 2007). Estas diferencias pueden reflejarse en la plasticidad para responder a fluctuaciones ambientales, así como en la capacidad de reprogramación de células para iniciar un proceso organogénico. La modificación de histonas y la metilación del ADN permiten a la planta establecer la regulación transcripcional necesaria para su desarrollo y las respuestas adaptativas al ambiente (Vaillant y Paszkowski, 2007). La actividad de los genes de la familia GRAS también está asociada con factores epigenéticos (Gao *et al.*, 2004). Además, con la maduración se acentúa el proceso de determinación celular, de forma que las células que han adquirido cierto grado de diferenciación también han sufrido modificaciones epigenéticas que limitan su capacidad de desdiferenciación y adquisición de un nuevo destino celular (Hackett, 1985; Greenwood y Hutchison, 1993). La pérdida de capacidad rizogénica es el resultado de la pérdida de plasticidad de las células para cambiar el destino celular en respuesta al estímulo auxínico.

#### 4.2.4. Inducción y desarrollo del enraizamiento adventicio

En el sistema de castaño existe una correlación entre los niveles de expresión de los genes *CsERF1*, *CsSCL1*, *CsSHR2*, *CsENOD93* y *CsGH3.2* y la inducción del EA. Estos genes actúan a través de la vía de señalización auxínica siendo promovidos por la aplicación exógena de AIB e inhibidos por la aplicación de NPA. Una respuesta similar fue descrita en los genes como *CSDNAJ-1* y *CSCDPK5*, ya que el NPA previene el EA y bloquea su expresión (Xuan *et al.*, 2008). La inducción temprana por auxina de estos cinco genes justo antes de que se inicien las divisiones, sugiere su importante papel en las etapas iniciales del



proceso de EA, como ya había sido propuesto en el caso del gen *CsSCL1* (Sánchez *et al.*, 2007; Vielba *et al.*, 2011). Además en el caso de los genes *CsERF1* y *CsSCL1* se confirma que independientemente del tipo de explanto empleado, son los mismos tipos celulares los que participan en el proceso de EA. Son por lo tanto, las células del cambium del material juvenil las que tienen la capacidad de reiniciar su patrón de expresión, o al menos la de genes específicos.

A pesar de que no se evaluó la regulación transcripcional, actividad o funcionalidad de las proteínas en este sistema de castaño, dada la correlación entre activación celular, expresión génica y respuesta fisiológica, es altamente probable que estén controlando la inducción del EA. En base a la elevada similitud de las secuencias homólogas, asumimos que estas proteínas presentan mecanismos de respuesta y de regulación similares.

En el caso de los genes *CsSCL3*, *CsSHR1*, *CsRLK* y *CsUGT* los datos de expresión no son concluyentes. *CsUGT*, está implicado en la vía de señalización auxínica, pero regulado de forma negativa. Los genes *CsSHR1* y *CsSCL3* no regulados por auxina, al menos en la concentración testada, se inducen por NPA por lo puede ser que dicha inducción esté jugando un papel determinante en la inhibición o el retraso de la fase de inducción pero a través de otras rutas de señalización. La respuesta de ciertos genes que se inducen por NPA sin verse afectados por el tratamiento de auxinas puede deberse a que el NPA afecta a otros factores, como puede ser el provocar un incremento en la concentración de etileno y deficiencias en la respuesta al ABA (Harbage y Stimart, 1996b; Koukourikou-Petridou y Bangerth, 1997; Woodward y Bartel, 2005). Los mutantes *auf1* se ven afectados por el NPA pero no por auxinas (Zheng *et al.*, 2011). Nuestros resultados sugieren que las primeras etapas de formación de RAs en hojas están determinadas por los cambios experimentados en las primeras 24 horas antes de que se organice el primordio radicular y comiencen las primeras divisiones, como ya ocurría en brotes (Ballester *et al.*, 1999). Muchos genes asociados con la reorganización celular y el inicio de la división celular durante la formación de RAs, están implicados en la pared celular primaria, el citoesqueleto y ciclo celular (Sánchez *et al.*, 1995; Hutchison *et al.*, 1999; Brinker *et al.*, 2004). Estos genes podrían ser potenciales dianas de algunos de los genes caracterizados como el *CsERF1*, *CsSCL1* y *CsSHR2*.

Por tanto, en concordancia con otros autores nuestros resultados sugieren que los genes de la familia AP2/ERF (Imin *et al.*, 2007; Rigal *et al.*, 2012; Trupiano *et al.*, 2013; de Almeida *et al.*, 2015) y SCARECROW (Casson and Lindsey, 2003; Solé *et al.*, 2008; Covelo *et al.*, 2009; Pop *et al.*, 2011; Vielba *et al.*, 2011) son factores de transcripción que regulan el

desarrollo de la planta, de RLs y RAs mediante la transducción de la señal y regulando la interacción entre diferentes rutas de señalización (Xu *et al.*, 2011). Controlan la proliferación celular, el mantenimiento del meristemo y el establecimiento del patrón radial radicular (Parizot and Beeckman, 2013; Legué *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2015). Los genes de la familia GH3 participan la homeostasis de auxinas formando conjugados a aminoácidos y regulando el EA (Sorin *et al.*, 2005; Guilfoyle and Hagen, 2007; Ludwig-Müller, 2011; Ahkami *et al.*, 2013). Ciertos genes de la familia UGT podrían estar regulando los niveles endógenos de flavonoides lo que determina la capacidad rizogénica. Estas cuatro familias génicas actúan en la ruta de señalización auxínica pudiendo ser regulados por los *ARF*. La familia de proteínas ENOD, descrita en el proceso de nodulación podría participar de forma similar en diversos procesos organogénicos. Finalmente el gen *CsRLK*, participara en la respuesta celular regulando la actividad enzimática que controla el ciclo celular y actuando en la proliferación de meristemas (Shpak *et al.*, 2004; Zan *et al.*, 2013).

## ***B. POPULUS***

### **5. RESPUESTA RIZOGÉNICA A LA MANIPULACIÓN HORMONAL**

Para completar el estudio se evaluó la respuesta de dos líneas transgénicas de *Populus* que contienen una construcción con el promotor del gen *PtSHR1* fusionado al gen marcador *GUS* (*pPtSHR1::GUS*). Se determinó la respuesta fisiológica de los brotes a la manipulación de las rutas de señalización de las auxinas y las giberelinas, debido a su acción promotora e inhibidora del enraizamiento, respectivamente. Por ello, la aplicación de AIB y PAC debería promover ciertos aspectos de la respuesta rizogénica de los brotes de chopo y el NPA y AG3 inhibirlos (Tabla 30). En contra de lo esperado, la aplicación de AIB no promovió el EA. Esto se debe a que el chopo es una especie de fácil enraizamiento que no requiere de la aplicación exógena de auxinas para desencadenar el proceso de EA. La simple escisión del brote ya induce el TPA y su acumulación en la zona basal desencadenando la formación de RAs de forma focalizada 1-2 mm por encima del corte (Fig. 42). La aplicación de AIB supone un exceso de la concentración hormonal ejerciendo un efecto negativo.

En las líneas de chopo, tanto la aplicación de NPA como AG3 afectaron negativamente al porcentaje de enraizamiento y al número de raíces desarrolladas. El NPA, al igual que ocurría en castaño, retrasó el tiempo requerido para la emergencia e inhibió el crecimiento de raíces y

brotos. Ya que el efecto del AIB y NPA en el desarrollo de RAs ha sido discutido en este trabajo en base a los resultados de castaño, en este apartado profundizaremos en el efecto de la ruta de señalización de las giberelinas. La aplicación de AG3 en las líneas de *Populus* evaluadas también retrasó ligeramente la emergencia de las raíces y alteró el desarrollo de RLs. El efecto inhibitorio de las giberelinas en la formación de RAs también fue observado en tabaco (Niu *et al.*, 2013). El menor desarrollo de las RLs puede estar relacionado con el papel de las giberelinas regulando la actividad del ciclo celular en el ápice de la raíz (Achard *et al.*, 2009), afectando en este caso al ápice de las RLs. Podría esperarse que la inclusión de AG3 en el medio, afectara positivamente al crecimiento de raíces y brotes, aumentando la longitud de la raíz más larga y el reemprendimiento de crecimiento, ya que la sobreexpresión de giberelinas genera fenotipos más altos (revisado en Mauriat *et al.*, 2011). Sin embargo, la ausencia de este efecto en nuestros resultados, podría ser debida a que al inhibir el enraizamiento también se alteró el desarrollo normal del brote. Los niveles altos de giberelinas inhiben las primeras etapas de la inducción (Moubayidin *et al.*, 2010) y la emergencia de las RAs, sin embargo, es necesaria su precisa focalización en el cilindro vascular o en el xilema del tallo para que tenga lugar el EA (Mauriat *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2013). El crecimiento de la raíz es mantenido y regulado por el balance entre proliferación y diferenciación celular, resultado de la división y elongación celular en el meristemo radicular (Scheres, 2007; Moubayidin *et al.*, 2010). Las giberelinas promueven la expansión celular estimulando y regulando la actividad del ciclo celular en el meristemo de la raíz gracias a que inducen la degradación de las proteínas DELLA (Silverstone *et al.*, 2001; Achard *et al.*, 2009).

La aplicación de PAC promovió la formación de raíces en las líneas de chopo y ejerció un efecto negativo en el crecimiento de las raíces y del brote (Tabla 36). La deficiencia en giberelinas genera plantas enanas (Yelenosky *et al.*, 1993). Además el tratamiento con PAC incrementa en más del 40% la supervivencia de las plantas transferidas a condiciones *ex vitro*, aunque las plantas son más pequeñas, con entrenudos cortos, las hojas son más gruesas y con mayor contenido en clorofilas (Wen *et al.*, 2013). La disminución de la longitud de las raíces y el incremento de su espesor también fue observado en otras especies (Cui *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2013). Sorprendentemente el PAC no modificó significativamente el contenido en ácido giberélico en el ápice de la raíz pero redujo un 53% el contenido en AIA (Wen *et al.*, 2013), esto demuestra que las diferentes vías de señalización hormonal están interrelacionadas y la manipulación hormonal desencadena respuesta diferentes en los distintos tejidos. En *Populus tremula* x *P. alba* se observó que en dos líneas transgénicas, una de ellas deficiente y otra

insensible al ácido giberélico, se alteró el patrón de expresión génica en el desarrollo de las RLs. Se modificó significativamente la expresión de 2069 genes, de los cuales 1178 están implicados en promover la proliferación celular, el crecimiento y la degradación de la pared celular. Además, en estas líneas se alteró el patrón de expresión de genes que codifican para las proteínas que participan en el eflujo del TPA, lo que sugirió la implicación de la ruta señalización de las giberelinas en la regulación de otras hormonas como auxinas (Gou *et al.*, 2010).

## 6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PtSHR1*

El desarrollo de RAs está controlado por las rutas de señalización hormonal, tanto de las auxinas como de las giberelinas. En las líneas de *Populus* analizadas en este trabajo, la aplicación y mantenimiento en el medio de cultivo de diversos reguladores de crecimiento generó cambios en el desarrollo de la raíz. Los cambios evaluados a nivel histológico se correlacionaron con el patrón de expresión del gen *PtSHR1*. Aunque en *Populus* se han identificado tres genes *SHR*, *PtSHR1* es el que presenta mayor grado de homología y funciones similares con *AtSHR*, el único identificado en *Arabidopsis*, (Wang *et al.*, 2011). El gen *AtSHR* regula el desarrollo de la raíz desde tres aspectos diferentes: regulando la transcripción, modulando el balance hormonal y las rutas de señalización (Levesque *et al.*, 2006).

La aplicación de AG3 en las plantas de *Populus* incrementó las divisiones celulares en el ápice de la raíz, siendo estas más desorganizadas dando lugar a una pérdida del patrón radial radicular. Por el contrario, el PAC redujo dichas divisiones, generando un meristemo apical muy pequeño, correlacionado con niveles bajos de expresión de *PtSHR1*. Esto se debe a que la organización del meristemo radicular requiere del mantenimiento de un balance entre la división celular y la diferenciación (Moubayidin *et al.*, 2010). Las giberelinas controlan el tamaño del meristemo de la raíz, afectando a las células meristemáticas troncales (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). De esta forma incrementan el número de células meristemáticas y las divisiones celulares del meristemo apical de la raíz regulando su crecimiento (Scheres, 2007). La reducción del tamaño del meristemo radicular observado en el tratamiento con PAC, es probablemente debido a una acumulación de proteínas DELLA, de forma similar a lo observado en otros trabajos (Achard *et al.*, 2009). La manipulación de la ruta de señalización auxínica también alteró el desarrollo del meristemo apical de la raíz, completamente

organizado y de mayor tamaño en las muestras tratadas con AIB y más pequeño y con divisiones desorganizadas en las tratadas con NPA. Un incremento en el número de células meristemáticas y de la caliptra también se observó en el ápice de la raíz de mutantes *shr-1*, desarrolladas en medios con AIB y Kin (Della Rovere *et al.*, 2015). La especificación y mantenimiento de la actividad del CQ viene determinada por diversos factores de transcripción como PLETHORA1, SCR y SHR (Helariutta *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006). Nuestros resultados mostraron un gran cambio en el patrón de expresión del gen *SHR* generado principalmente por los tratamientos con AG3, PAC y NPA, aunque también se observaron ligeros cambios tanto en los primordios como en las raíces desarrolladas en presencia de AIB. Por el contrario, Achard *et al.* (2009) no observaron modificaciones en el patrón de expresión de los genes *SCR*, *SHR* y *PLT1* ante los tratamientos con giberelinas y PAC. Estos autores sugirieron que la señalización de las giberelinas controla el ratio de división de las células meristemáticas de la raíz sin interferir en la especificación o actividad del nicho de células madre. Nuestros resultados sugieren que en presencia de PAC se inhiben las divisiones y se incrementa la especificación celular por un descenso en los niveles de *PtSHR1*. Por el contrario, AG3 incrementa la expresión de *PtSHR1*, lo que induce las divisiones y mantiene la capacidad meristemática de las células. La adquisición de identidad del tejido basal de la raíz está regulada por el *SHR* (Benfey *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011; Hao y Cui, 2012).

El crecimiento de la raíz se vio inhibido por la aplicación de NPA y PAC, sin embargo no se vio afectado por la aplicación de AG3 y AIB con respecto a las muestras control. El gen *SHR* es esencial para el crecimiento de la raíz ya que es indispensable para la actividad de su meristemo apical (Lucas *et al.*, 2011). El crecimiento de la raíz se ve acelerado por el incremento en el número de células meristemáticas y el tamaño del meristemo (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), lo que concuerda con el menor desarrollo del meristemo y menor tamaño de las raíces desarrolladas en presencia de PAC o NPA y el cambio de patrón del gen *PtSHR1*. En *Arabidopsis thaliana* el tratamiento con PAC redujo la tasa de crecimiento de la raíz, el tamaño del meristemo y el tamaño de las células maduras (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Por lo tanto las auxinas y giberelinas promueven y mantienen el crecimiento de la raíz controlando el tamaño del meristemo apical. El PAC reduce el número de células mitóticas y el AG3 y el NPA promueve la actividad mitótica del meristemo, por lo tanto hay un control de la proliferación celular a través de las proteínas DELLA y las giberelinas (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Se han descrito los mutantes del gen *SHRUBBY* (*SHBY*), que presentan alterado el patrón longitudinal y radial de la raíz a través de la regulación de *SHR*, *SCR*, *PLT1*, *PLT2* y la



señalización de las giberelinas (Koizumi y Gallagher, 2013). Estos mutantes *shby*, con un crecimiento radicular reducido muestran una menor expresión de estos genes en el ápice de la raíz, y son insensibles a las giberelinas y al PAC. *SHBY* puede actuar de unión entre *SCR*-*SHR* y *PLT* en el mantenimiento del crecimiento de la raíz, en la regulación de las divisiones celulares y en el mantenimiento del CQ (Koizumi y Gallagher, 2013).

La alteración del patrón de expresión del gen *PtSHR1* en el ápice de la raíz, en respuesta a los diferentes tratamientos, provocó graves alteraciones en el mantenimiento de la identidad del CQ. Los tratamientos con NPA y AG3 indujeron su sobreexpresión en el meristemo central, pudiendo ocasionar una desestabilización de la estructura del CQ. Tanto el meristemo de los primordios como el ápice radicular muestran una pérdida o alteración de la distribución radial de las células, especialmente con la aplicación de NPA. Cabe recordar que los genes *SHR* y *SCR*, así como otros genes de esta familia, regulan la especificación y mantenimiento del patrón radial del meristemo radicular (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Pysh *et al.*, 1999; Helariutta *et al.*, 2000; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Sabatini *et al.*, 2003; Bolle, 2004; Vernoux y Benfey, 2005; Xu *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2011). En los mutantes *shr-1* destaca la ausencia de CQ en RAs maduras (Della Rovere *et al.*, 2015). Asimismo se demostró que ante la pérdida del CQ, el gen *SCR* participa en su restauración (Xu *et al.*, 2006). La pérdida de la función de los genes *SHR* y *SCR* genera raíces con el desarrollo de capas aberrantes de tejido fundamental (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000). Esto también se refleja en las raíces de *Populus* desarrolladas en presencia de NPA o AG3, que muestran alterado el patrón radial del primordio por la aparición de divisiones ectópicas. Otra de las observaciones en *Populus* es el cambio en el espesor del córtex de las raíces desarrolladas en medios que contienen NPA, AG3 o PAC. Las desarrolladas tanto en NPA como en AG3 poseen pocas capas de células corticales, mientras que en las originadas en medio con PAC se incrementó considerablemente el número de las mismas. Estos tratamientos afectaron también a otro tipo de tejidos, así el espesor de la estela se promovió en el tratamiento con AG3 y se redujo en el de PAC. Estos cambios morfológicos, parecen estar correlacionados con la expresión de *PtSHR1* confirmando el papel indispensable de *SHR* en la formación del córtex, descrita ya en otros estudios (Heo *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2016).

El desarrollo del córtex se redujo al incrementar la expresión de *SHR*, ya que inhibe las divisiones periclinales de las células iniciales del córtex y la endodermis tanto en el ápice como en la zona media de la raíz. Por el contrario, fue promovido por niveles bajos de transcrito localizados en las células de la estela, como ya se había observado en trabajos previos (Heo *et al.*, 2011; Koizumi *et al.*, 2012b; Gong *et al.*, 2016). La abundancia de



proteína SHR cambia la dinámica de desarrollo de la raíz (Koizumi *et al.*, 2012b). De acuerdo al patrón de expresión de *PtSHR1*, el desarrollo del meristemo radicular y la implicación del gen *SHR* en su organización, todo indica a que niveles de expresión intermedios conllevan a un desarrollo correcto de la raíz manteniendo una tasa media de las divisiones periclinales, como ocurre en los tratamientos con AIB y sin reguladores de crecimiento. Niveles de expresión elevados inhiben las divisiones periclinales de la endodermis, reduciendo la formación de córtex, como ocurre en las raíces desarrolladas en medio con NPA y AG3. Por el contrario, niveles bajos promueven las divisiones periclinales y el desarrollo de córtex. Esta proteína puede actuar como promotora o inhibidora de las divisiones periclinales en función de su concentración y del tejido en el que se localice. El córtex se inicia por divisiones periclinales de las células iniciales que recubren el CQ, que ocurren en diferente posición y momento del desarrollo de la raíz. No se conocen los mecanismos que determinan donde y cuando SHR actúa promoviendo las divisiones celulares (Koizumi *et al.*, 2012b). Como señalábamos en la introducción, para la determinación de los tejidos del córtex y la endodermis requiere de la presencia de dos factores de transcripción el *SCARECROW* (*SCR*) y el *SHORTROOT* (*SHR*) (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Kamiya *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007; Cui y Benfey, 2009; Koizumi *et al.*, 2012a,b). El gen *SHR* se expresa en las células de la estela y la proteína se traslada a las células adyacentes de la endodermis, lo que indica que el gen *SHR* parece estar implicado en la determinación del córtex y en las divisiones periclinales de las células iniciales del córtex y la endodermis (Helariutta *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2006). Este proceso está regulado por las giberelinas (Baum *et al.*, 2002; Heo *et al.*, 2011). El gen *SCR* se expresa en la endodermis durante su formación y maduración de la raíz, participando en la determinación de las células endodérmicas y restringiendo la localización del *SHR* (Sena *et al.*, 2004). La alteración de otros genes como el *SCR* o el *JACKDAW*, regula los movimientos de la proteína SHR al núcleo o fuera de la endodermis. Esto genera un aumento en el número de capas de la raíz, por divisiones ectópicas en el tejido fundamental (Koizumi *et al.*, 2012b). Las proteínas SCR y SHR actúan de forma conjunta activando el gen *CYCD6.1* para que tengan lugar las divisiones periclinales que separan la endodermis y el córtex, y posteriormente dichas proteínas se degradan en las células del córtex para evitar un exceso de divisiones periclinales (Heidstra *et al.*, 2004). En *Arabidopsis* los mutantes deficientes en el gen *SHR* carecen de la capa de células endodérmicas. En *Populus* hemos visto que el tratamiento con PAC disminuyó la actividad del *SHR*, originando divisiones precoces de la endodermis, y por ello dichas raíces son cortas, gruesas y con un córtex muy grueso. Otras de las funciones de las giberelinas son por un lado el control de la elongación celular, que se

reflejó especialmente en las células del córtex (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008), y por otro la especificación y mantenimiento de las células de la estela (Koizumi *et al.*, 2012b). El incremento en grosor de las raíces tratadas con PAC se debe al incremento en el número de capas y tamaño de las células corticales inducido por la reducción de los niveles de PAC. Contradictoriamente en otros trabajos la aplicación de PAC incrementó los niveles de transcrito *SHR* pero el ratio de expresión entre la endodermis y la estela disminuye, por lo que propusieron que el PAC induce la formación de córtex, reduciendo la actividad en la endodermis independientemente de los niveles de transcrito (Koizumi *et al.*, 2012b).

La acción del ácido giberélico reprime la expresión de ciertos genes GRAS como el *SCL3*, *SCR* y *SHR* promoviendo la formación de córtex (Heo *et al.*, 2011). En base a un estudio con mutantes, se ha propuesto que el gen *SEU* regula estos genes a través de la ruta de señalización de las giberelinas, cuyo expresión se reprime por el incremento de giberelinas y se induce por la aplicación de PAC (Gong *et al.*, 2016). El gen *SCL3*, cuya expresión se inhibe por giberelinas y se induce por PAC, se expresa en la endodermis y actúa en la integración de la señalización de las giberelinas con la vía de actuación del complejo *SHR/SCR* (Heo *et al.*, 2011). *SCL3* es un integrador de la señal de las giberelinas específicamente en la endodermis y un regulador positivo de la degradación de *DELLA*. De esta manera *SCL3* regula la formación de córtex por la maduración del tejido fundamental del ápice de la raíz.

Por otro lado a las giberelinas se les ha atribuido un importante papel en la xilogénesis. Nuestros resultados mostraron que los diferentes tratamientos hormonales alteraron el patrón de expresión del gen *PtSHR1* y con él, el desarrollo del cilindro vascular. Las raíces desarrolladas en medio con AG3 incrementan el desarrollo de la estela y se reduce en las raíces desarrolladas en presencia de PAC. Además durante del desarrollo de los primordios el tratamiento con AIB incrementó la expresión del gen *PtSHR1* en el tejido vascular en la inserción de la raíz emergente con el brote incrementando también los elementos vasculares. En mutantes *shr-1* de *Arabidopsis thaliana*, el tratamiento con AIB y Kin generó mayor desarrollo de los elementos vasculares que conectan las RAs con el tallo (Della Rovere *et al.*, 2015). Aunque en general, las auxinas inducen diferenciación del xilema y las citoquininas del floema, el patrón vascular está controlado por el gen *SHR* mediante la regulación de la homeostasis de citoquininas (Hao y Cui, 2012). El gen *SHR* actúa también regulando las divisiones asimétricas en el procambium que dirigen el desarrollo del floema y el xilema (Yu *et al.*, 2010). En las plantas tratadas con PAC o mutantes insensibles a las giberelinas además de mostrar un fenotipo enano, hay una reducción de la xilogénesis y lignificación, por el

contrario, el incremento en la biosíntesis de giberelinas incrementa la xilogénesis (Mauriat *et al.*, 2011). Como ya mencionamos anteriormente las giberelinas alteran el TPA por lo que es necesaria una precisa localización de giberelinas activas en el tejido vascular para el correcto desarrollo de la planta. Tanto el crecimiento primario como secundario se ven afectados por el catabolismo de giberelinas, llevado a cabo principalmente mediante oxidación, pero también por epoxidación y metilación (Mauriat *et al.*, 2011). El gen *AtSHR* participa en la división y especificación durante el desarrollo del tejido vascular de la raíz (Cui *et al.*, 2007), el *PtSHR* regula la actividad meristemática en diferentes tejidos y órganos (Wang *et al.*, 2011) y los genes *PttSHR1* y *PttSHR2* se expresan en el cambium y regulan el desarrollo del tejido vascular (Schrader *et al.*, 2004). Recientemente se mostró una relación inversa entre los procesos de formación de RAs y la xilogénesis, en los cuales participan los genes *SHR*, *SCR* y *AUX1* (Della Rovere *et al.*, 2015). En especies recalcitrantes incapaces de enraizar la aplicación de AIA incrementa la xilogénesis (Reverberi *et al.*, 2001).

El gen *SHR* actúa mediante la regulación transcripcional, la regulación de las rutas de señalización hormonal y la transducción de la señal de las RLKs, regulando directamente la expresión de 8 genes entre los que se encuentra el *SCR* (Levesque *et al.*, 2006). Dado que las quinasas están sobrerrepresentadas en el grupo de genes reprimidos por el *SHR* y el 75% se trata de RLKs, estas deben jugar un papel clave en la mediación de la respuesta del *SHR* (Levesque *et al.*, 2006). La expresión del *SHR* también podría estar regulada por otras rutas de señalización hormonal, como el ABA, compuesto al que los mutantes *shr* son hipersensibles (Cui *et al.*, 2012). El ABA puede promover o inhibir el enraizamiento en función de la especie, en general los niveles endógenos de ABA se asocian positivamente con el enraizamiento en especies forestales (Blakesley *et al.*, 1991) interactuando con las auxinas o actuando antagónicamente con la inhibición de las giberelinas, sin embargo en tomate inhibió el enraizamiento (Kittrell *et al.*, 2006).

Todo ello refleja el importante papel de las auxinas y giberelinas en el mantenimiento del CQ, en el control de la proliferación de las células meristemáticas, y regulando niveles de expresión de *PtSHR1*.



# Conclusiones







**Conclusión 1:**

Se ha desarrollado un sistema experimental de hojas para el estudio del enraizamiento adventicio y de la pérdida de capacidad rizogénica asociada a la adquisición del estado adulto, que presenta una respuesta fisiológica, anatómica y molecular similar al sistema de brotes, dependiente del estado ontogenético.

**Conclusión 2:**

La reprogramación y reactivación de las células competentes para formar raíces es dependiente del transporte polar de auxinas, siendo determinante durante las primeras 48 horas del proceso de inducción, ya que la aplicación de NPA inhibe considerablemente el proceso de enraizamiento. El efecto del NPA es local y dependiente del tiempo y momento de su aplicación, afectando también al desarrollo de las raíces adventicias.

**Conclusión 3:**

La identificación y caracterización de dos secuencias completas (*CsSCL3*, *CsSHR1*) y dos parciales (*CsSHR2* y *CsSCR1*) de factores de transcripción de familia GRAS; del gen *CsGH3.2* de la familia GH3 que participa en el catabolismo de auxinas; del gen *CsUGT* de la familia de las UDP-glicosiltransferasas y del gen *CsENOD93* de la familia de las nodulinas tempranas.

**Conclusión 4:**

La abundante expresión relativa de los genes *CsUGT*, *CsENOD93*, *CsGH3.2*, *CsERF1*, *CsSCL1* y *CsSCL3* en la raíz indica que están implicados en su desarrollo y/o en el de raíces laterales como *CsSCL1* y *CsGH3.2*. Los genes *CsERF*, *CsSCL1*, *CsLRK* y *CsGH3.2* actúan en células meristemáticas en proliferación y en el mantenimiento del patrón radicular y *CsSCL1* interviene en el mantenimiento del centro quiescente.

**Conclusión 5:**

La inducción temprana por auxina de los genes *CsERF1*, *CsSCL1*, *CsGH3.2*, *CsSHR2*, *CsENOD93* en el material competente para enraizar y su represión por NPA establece una correlación directa entre expresión génica y capacidad de enraizamiento, indicando un papel importante de estos genes en las primeras etapas de la inducción del enraizamiento adventicio.

**Conclusión 6:**

La localización específica de los genes *CsERF1*, *CsSCL1* en las células competentes para formar raíces en respuesta a la auxina muestra que están implicados en la dediferenciación y adquisición del destino de las células que darán lugar a los primordios, mediante reactivación de las células del cambium.

**Conclusión 7:**

La manipulación hormonal de los brotes de *Populus* muestra que la aplicación de PAC promueve su capacidad rizogénica y el AG3 y NPA la inhiben, afectando también a la morfología de las raíces. Ambos, NPA y PAC generan raíces cortas, además el NPA reduce su grosor y el PAC lo incrementa.

**Conclusión 8:**

La expresión de *PtSHR1* está regulada por las rutas de señalización de auxinas y giberelinas. La aplicación de PAC, inhibe su expresión promoviendo la diferenciación celular y la formación de córtex, mientras que AG3 y NPA incrementan su expresión y promueven divisiones ectópicas. La modificación del patrón de expresión en respuesta a PAC, AG3 y NPA, demuestra el papel de *PtSHR1* en el correcto funcionamiento del centro quiescente, control de las divisiones iniciales y mantenimiento del patrón radial radicular, siendo necesarios niveles intermedios para un correcto desarrollo de la raíz.

# Bibliografía





- Abarca D, Díaz-sala C.** 2009. Reprogramming adult cells during organ regeneration in forest species. *Plant signaling & behavior* **4**, 793–795.
- Abarca D, Pizarro A, Hernández I, Sánchez MC, Solana SP, Del Amo A, Carneros E, Díaz-Sala C.** 2014. The GRAS gene family in pine: transcript expression patterns associated with the maturation-related decline of competence to form adventitious roots. *BioMed Central plant biology* **14**, 354.
- Abu-Abied M, Szwerdszarf D, Mordehaev I, Levy A, Rogovoy O, Belausov E, Yaniv Y, Uliel S, Katzenellenbogen M, Riov J, Ophir R, Sadot E.** 2012. Microarray analysis revealed upregulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of *Eucalyptus grandis*, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation. *The Plant Journal* **71**, 787–799.
- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GTS, Genschik P.** 2009. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current biology* **19**, 1188–1193.
- Ahkami AH, Melzer M, Ghaffari MR, Pollmann S, Javid MG, Shahinnia F, Hajirezaei MR, Druege U.** 2013. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta* **238**, 499–517.
- Ahn JH, Choi Y, Kim SG, Kwon YM, Do Choi Y, Lee JS.** 1998. Expression of a soybean hydroxyproline-rich glycoprotein gene is correlated with maturation of roots. *Plant physiology* **116**, 671–679.
- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Trapero-Mozos A, Climent MFL, Gómez-Cadenas A, Gómez-Gómez L.** 2015. Ectopic expression of a stress-inducible glycosyltransferase from saffron enhances salt and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* while alters anchor root formation. *Plant Science* **234**, 60–73.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B.** 2004. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**, 109–120.
- de Almeida M, de Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, de Abreu-Tarazi MF.** 2012. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. *Plant Cell Reports* **31**, 1495–1515.
- de Almeida MR, de Bastiani D, Gaeta ML, de Araújo Mariath JE, de Costa F, Retallick J, Nolan L, Tai HH, Strömvik MV, Fett-Neto AG.** 2015. Comparative transcriptional analysis provides new insights into the molecular basis of adventitious rooting recalcitrance in *Eucalyptus*. *Plant Science* **239**, 155–165.
- Almeida IF, Pinto AS, Monteiro C, Monteiro H, Belo L, Fernandes J, Bento AR, Duarte TL, Garrido J, Bahia MF, Sousa Lobo JM, Costa PC.** 2015. Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* **144**, 28–34.
- Altamura MM, Capitani F, Serafini-Fracassini D, Torrigiani P, Falasca G.** 1991. Root histogenesis from tobacco thin cell layers. *Protoplasma* **161**, 31–42.
- Altschul SF.** 1997. Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments. In: Suhai S. Eds. *Theoretical and computational methods in genome research*. Plenum Press, New York, 1–14.
- Amo-Marco JB, Vidal N, Viéitez AM, Ballester A.** 1993. Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut. *Journal of plant physiology* **142**, 117–119.
- Atreya CD, Rao JP, Subrahmanyam NC.** 1984. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledon segments. *Plant science letters* **34**, 379–383.
- Bai X, Todd CD, Desikan R, Yang Y, Hu X.** 2012. N-3-oxo-decanoyl-L-homoserine-lactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean. *Plant Physiology* **158**, 725–736.

- Bailly A, Sovero V, Vincenzetti V, Santelia D, Bartnik D, Koenig BW, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M.** 2008. Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 21817–21826.
- Ballester A, San José MC, Vidal N, Fernández-Lorenzo JL, Viéitez AM.** 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany* **83**, 619–629.
- Ballester A, Vidal N, Viéitez AM.** 2009. Developmental stages during *in vitro* rooting of hardwood trees from material with juvenile and mature characteristics. In: Niemi K and Scagel C. Eds. *Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications*. Research Signpost Kerala, India, 277–296.
- Band LR, Ubeda-Tomas S, Dyson RJ, Middleton AM, Hodgman TC, Owen MR, Jensen OE, Bennett MJ, King JR.** 2012. Growth-induced hormone dilution can explain the dynamics of plant root cell elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 7577–7582.
- Baque MA, Hahn EJ, Paek KY.** 2010. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **46**, 71–80.
- Barvkar VT, Pardeshi VC, Kale SM, Kadoo NY, Gupta VS.** 2012. Phylogenomic analysis of UDP glycosyltransferase 1 multigene family in *Linum usitatissimum* identified genes with varied expression patterns. *BioMed Central, Genomics* **13**, 175.
- Baum SF, Dubrovsky JG, Rost TL.** 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *American Journal of Botany* **89**, 908–920.
- Bellamine J, Penel C, Greppin H, Gaspar T.** 1998. Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. *Plant Growth Regulation* **26**, 191–194.
- Bellini C, Pacurar DI, Perrone I.** 2014. Adventitious roots and lateral roots: Similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 639–666.
- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser MT, Aeschbacher RA.** 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57–70.
- Benfey PN, Scheres B.** 2000. Root development. *Current Biology* **10**, R813–R815.
- Benková E, Hejátko J.** 2009. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology* **69**, 383–396.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J.** 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591–602.
- Berleth T, Sachs T.** 2001. Plant morphogenesis: Long-distance coordination and local patterning. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 57–62.
- Bertioli D.** 1997. Rapid amplification of cDNA ends. In: White BA. Eds. *Methods in Molecular Biology*, Vol 67, PCR cloning protocols: from molecular cloning to genetic engineering. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 233–238.
- Besford RT, Hand P, Peppitt SD, Richardson CM, Thomas B.** 1996. Phase change in *Prunus avium*: differences between juvenile and mature shoots identified by 2-dimensional protein separation and *in vitro* translation of mRNA. *Journal of Plant Physiology* **147**, 534–538.
- Bi YM, Kant S, Clark J, Gidda S, Ming F, Xu J, Rochon A, Shelp BJ, Hao L, Zhao R, Mullen RT, Zhu T, Rothstein SJ.** 2009. Increased nitrogen-use efficiency in transgenic rice plants over-expressing a nitrogen-responsive early nodulin gene identified from rice expression profiling. *Plant, Cell and Environment* **32**, 1749–1760.



- Biricolti S, Fabbri A, Ferrini F, Pisani PL.** 1994. Adventitious rooting in chestnut: an anatomical investigation. *Scientia Horticulturae* **59**, 197–205.
- Bishopp A, Help H, El-Showk S, Weijers D, Scheres B, Friml J, Benková E, Mähönen AP, Helariutta Y.** 2011. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology* **21**, 917–926.
- Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS.** 2005. Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 494–500.
- Blakesley D, Weston GD, Hall JF.** 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. *Plant Growth Regulation* **10**, 341–353.
- Blazich FA.** 1988. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. *Advances in plant sciences series (USA)* **2**, 132–149.
- Bolle C.** 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**, 683–692.
- Bolle C.** 2015. Chapter 19. Functional Aspects of GRAS Family Proteins. In: González DH. Eds. *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 295–312.
- Bolle C, Koncz C, Chua NH.** 2000. PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes & Development* **14**, 1269–1278.
- Bon MC, Riccardi F, Monteuuis O.** 1994. Influence of phase change within a 90-year-old *Sequoia sempervirens* on its *in vitro* organogenic capacity and protein patterns. *Trees* **8**, 283–287.
- Bonga JM.** 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. In: Bonga JM, Durzan DJ. Eds. *Forestry Sciences. Tissue Culture in Forestry*. Springer Netherlands **5**, 387–412.
- Böttcher C, Dennis EG, Booker GW, Polyak SW, Boss PK, Davies C.** 2012. A novel tool for studying auxin-metabolism: the inhibition of grapevine indole-3-acetic acid-amido synthetases by a reaction intermediate analogue. *PLoS ONE* **7**, e37632.
- Braatne JH, Rood SB, Heilman PE.** 1996. Life history, ecology, and conservation of riparian cottonwoods in North America. In: Stettler R, Bradshaw T, Heilman P, Hinckley T. Eds. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Research Press, Canada, 57–85.
- Bradshaw Jr HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R.** 2000. Emerging model systems in plant biology : Poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Planr Growth Regulation* **19**, 306–313.
- Bradshaw Jr HD, Stettler RF.** 1993. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars. *Theoretical and Applied Genetics* **86**, 301–307.
- Bradshaw HD, Stettler RF.** 1995. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree. *Genetics* **139**, 963–973.
- Braga N, Rodrigues F, Oliveira MBPP.** 2015. *Castanea sativa* by-products: a review on added value and sustainable application. *Natural product research* **29**, 1–18.
- Bräutigam K, Vining KJ, Lafon-Placette C, Fossdal CG, Mirouze M, Gutiérrez Marcos J, Fluch S, Fernández Fraga M, Guevara A, Abarca D, Johnsen O, Maury S, Strauss SH, Campbell MM, Rohde A, Díaz-Sala C, Cervera MT.** 2013. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution* **3**, 399–415.
- Brinker M, Zyl L Van, Liu W, Craig D, Sederoff RR, Clapham DH, Arnold S Von.** 2004. Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*. *Plant Physiology* **135**, 1526–1539.
- Brown DCW, Thorpe TA.** 1986. Plant regeneration by organogenesis. *Cell culture and somatic cell genetics of plants* **3**, 49–65.

- Brunoni F, Rolli E, Dramis L, Incerti M, Abarca D, Pizarro A, Díaz-Sala C, Ricci A.** 2014. Adventitious rooting adjuvant activity of 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea and 1,3-di(benzo[d]oxazol-6-yl)urea: new insights and perspectives. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **118**, 111–124.
- Burnham CR.** 1988. The restoration of the american chestnut: Mendelian genetics may solve a problem that has resisted other approaches. *American Scientist* **76**, 478–487.
- Busov VB, Johannes E, Whetten RW, Sederoff RR, Spiker SL, Lanz-García C, Goldfarb B.** 2004. An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. *Planta* **218**, 916–927.
- Busov VB, Meilan R, Pearce DW, Rood SB, Ma C, Tschaplinski TJ, Strauss SH.** 2006. Transgenic modification of *gai* or *rgll* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. *Planta* **224**, 288–299.
- Butler ED, Gallagher TF.** 1999. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica* ‘Jork 9’) stem discs. *Journal of experimental botany* **50**, 551–552.
- Butler ED, Gallagher TF.** 2000. Characterization of auxin-induced ARRO-1 expression in the primary root of *Malus domestica*. *Journal of experimental botany* **51**, 1765–1766.
- Campbell MM, Brunner AM, Jones HM, Strauss SH.** 2003. Forestry’s fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant biotechnology journal* **1**, 141–154.
- Casasoli M, Derory J, Morera-dutrey C, Brendel O, Porth I, Guehl J, Villani F, Kremer A.** 2006. Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. *Genetics Society of America* **172**, 533–546.
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, Villani F.** 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and applied genetics* **102**, 1190–1199.
- Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi MC, Barreneche T, Lauteri M, Villani F.** 2004. Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1088–1101.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooze S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M.** 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant cell* **13**, 843–852.
- Casson SA, Lindsey K.** 2003. Genes and signalling in root development. *New Phytologist* **158**, 11–38.
- Cederholm HM, Iyer-Pascuzzi AS, Benfey PN.** 2012. Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **1**, 675–691.
- Chang KH, Xiang H, Dunaway-Mariano D.** 1997. Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS3 4-chlorobenzoate: coenzyme A ligase. *Biochemistry* **36**, 15650–15659.
- Charon C, Johansson C, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M.** 1997. *enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 8901–8906.
- Chen Y, Fan X, Song W, Zhang Y, Xu G.** 2012. Over-expression of *OsPIN2* leads to increased tiller numbers, angle and shorter plant height through suppression of *OsLAZY1*. *Plant biotechnology journal* **10**, 139–149.
- Chen X, Qu Y, Sheng L, Liu J, Huang H, Xu L.** 2014. A simple method suitable to study de novo root organogenesis. *Frontiers in Plant Science*, **5**:208.
- Cheniany M, Ebrahimzadeh H, Vahdati K, Preece JE, Masoudinejad A, Mirmasoumi M.** 2013. Content of different groups of phenolic compounds in microshoots of *Juglans regia* cultivars and studies on antioxidant activity. *Acta physiologiae plantarum* **35**, 443–450.

- Chevre AM, Gill SS, Mouras A, Salesses G.** 1983. *In vitro* vegetative multiplication of chestnut. Journal of Horticultural Science **58**, 23–29.
- Chhun T, Taketa S, Tsurumi S, Ichii M.** 2004. Different behaviour of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in stimulating lateral root development in rice (*Oryza sativa* L.). Plant growth regulation **43**, 135–143.
- Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ.** 1999. Root formation in ethylene-insensitive plants. Plant physiology **121**, 53–60.
- Clark NM, de Luis Balaguer MA, Sozzani R.** 2014. Experimental data and computational modeling link auxin gradient and development in the *Arabidopsis* root. Frontiers in plant science **5**, 328.
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM.** 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. Cell **89**, 575–585.
- Colot V, Rossignol JL.** 1999. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. Bioessays **21**, 402–411.
- Correa LR, Stein RJ, Fett-Neto AG.** 2012. Adventitious rooting of detached *Arabidopsis thaliana* leaves. Biologia Plantarum **56**, 25–30.
- Corredoira E, Ballester A, Ibarra M, Viéitez AM.** 2014. Induction of somatic embryogenesis in leaf and shoot apex explants from adult trees of the genus *Eucalyptus*. In: Park YS and Bonga JM. Eds. Proceeding of the third international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on "Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies." September 8-12, 2014. Vitoria-Gasteiz, Spain, 66-74.
- Corredoira E, Ballester A, Ibarra M, Viéitez AM.** 2015. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. Tree physiology, **35**, 678-690.
- Corredoira E, Ballester A, Viéitez FJ, Viéitez AM.** 2005. Somatic embryogenesis in chestnut. Plant Cell Monographs **2**, 177–199.
- Corredoira E, Montenegro D, San José MC, Viéitez AM, Ballester A.** 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. Plant Cell Reports **23**, 311–318.
- Corredoira E, San José MC, Viéitez AM, Ballester A.** 2009. Transformación genética de *Castanea sativa* Mill. y crioconservación de las líneas embriogénicas transformadas. Revista Real Academia Galega de Ciencias **28**, 23–36.
- Corredoira E, Valladares S, Allona I, Aragoncillo C, Viéitez AM, Ballester A.** 2012. Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-like protein (*CsTLL*) gene isolated from *Castanea sativa* seeds. Tree physiology **32**, 1389–1402.
- Corredoira E, Valladares S, Martínez MT, Viéitez AM, San José MC.** 2013. Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Trees **27**, 1597–1608.
- da Costa CT, de Almeida MR, Ruedell CM, Schwambach J, Maraschin FS, Fett-Neto AG.** 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. Frontiers in plant science **4**, 1-19.
- Čovanová M, Sauer M, Rychtář J, Friml J, Petrášek J, Zažímalová E.** 2013. Overexpression of the auxin binding PROTEIN1 modulates PIN-dependent auxin transport in tobacco cells. PloS ONE **8**, e70050.
- Covelo G, Ferro E, Vielba JM, Sánchez C.** 2009. Molecular analysis of adventitious rooting in Fagaceae species. In: Niemi K, Scagel C. Eds. Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications. Research Singpost, Kerala, 105–122.
- Cuenca B.** 1999. Morfogénesis *in vitro* de haya y roble, regeneración de plantas mediante caulogénesis y embriogénesis somática. Ph.D. Thesis. Universidad de Santiago de Compostela, Spain.

- Cuenca B, González L, Fernández MR, Ocaña L.** 2009. Micropropagación de genotipos adultos de *Castanea sativa* Mill. seleccionados por resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. In: Acta del 5º Congresos Forestales Español. Eds. Sociedad Española de Ciencias Forestales, Junta de Castilla y León. Avila.
- Cuenca B, Luquero L, Ocaña L.** 2013. Nuevos Materiales Forestales de Reproducción de *Castanea* sp. de categoría cualificado. In: Acta del 6º Congresos Forestales Español. Eds. Sociedad Española de Ciencias Forestales. Vitoria-Gasteiz.
- Cuenca B, San José MC, Martínez MT, Ballester A, Viéitez AM.** 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Reports **18**, 538–543.
- Cuenca B, Viéitez AM.** 1999. Histological study of *in vitro* development of adventitious buds on leaf explants of oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant **35**, 326–332.
- Cui H, Benfey PN.** 2009. Interplay between SCARECROW, GA and LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 in ground tissue patterning in the Arabidopsis root. The Plant Journal **58**, 1016–1027.
- Cui H, Gu X, Shi L.** 2009. *In vitro* proliferation from axillary buds and *ex vitro* protocol for effective propagation of *Syringa × hyacinthiflora* ‘Luo Lan Zi’. Scientia horticulturae **121**, 186–191.
- Cui H, Hao Y, Kong D.** 2012. SCARECROW has a SHORT-ROOT-independent role in modulating the sugar response. Plant Physiology **158**, 1769–1778.
- Cui H, Hao Y, Kovtun M, Stole V, Deng X-W, Sakakibara H, Kojima M.** 2011. Genome-Wide direct target analysis reveals a role for SHORT-ROOT in root vascular patterning through cytokinin homeostasis. Plant Physiology **157**, 1221–1231.
- Cui H, Levesque MP, Vernoux T, Jung JW, Paquette AJ, Gallagher KL, Wang JY, Blilou I, Scheres B, Benfey PN.** 2007. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. Science **316**, 421–425.
- Curir P, VanSumere CF, Termini A, Barthe P, Marchesini A, Dolci M.** 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant physiology **92**, 1148–1153.
- Czikkel BE, Maxwell DP.** 2007. *NtGRAS1*, a novel stress-induced member of the GRAS family in tobacco, localizes to the nucleus. Journal of Plant Physiology **164**, 1220–1230.
- Dafae NJ, Thomas JD, Shirk PD, Legaspi ME, Vaughan MM, Huffaker A, Teal PE, Schmelz EA.** 2013. European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) induced responses enhance susceptibility in maize. PloS one **8**, e73394.
- Dai N, Wang W, Patterson SE, Blecker AB.** 2013. The TMK subfamily of receptor-like kinases in *Arabidopsis* display an essential role in growth and a reduced sensitivity to auxin. PLoS ONE **8**, e60990.
- Dastidar MG, Jouannet V, Maizel A.** 2012. Root branching: mechanisms, robustness, and plasticity. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology **1**, 329–343.
- Davière JM, Achard P.** 2013. Gibberellin signaling in plants. Development **140**, 1147–1151.
- Day ME, Greenwood MS, Díaz-Sala C.** 2002. Age- and size-related trends in woody plant shoot development: regulatory pathways and evidence for genetic control. Tree physiology **22**, 507–513.
- Day RB, Shibuya N, Minami E.** 2003. Identification and characterization of two new members of the GRAS gene family in rice responsive to *N*-acetylchitoooligosaccharide elicitor. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression **1625**, 261–268.
- Delker C, Raschke A, Quint M.** 2008. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule’s message. Planta **227**, 929–941.



- Della Rovere F, Fattorini L, D'Angeli S, Veloccia A, Del Duca S, Cai G, Falasca G, Altamura MM.** 2015. Arabidopsis SHR and SCR transcription factors and AUX1 auxin influx carrier control the switch between adventitious rooting and xylogenesis *in planta* and in *in vitro* cultured thin cell layers. *Annals of botany* **115**, 617–628.
- Díaz-Sala C.** 2014. Direct reprogramming of adult somatic cells toward adventitious root formation in forest tree species: the effect of the juvenile–adult transition. *Frontiers in plant science* **5**, 1–8.
- Díaz-Sala C, Garrido G, Sabater B.** 2002. Age-related loss of rooting capability in *Arabidopsis thaliana* and its reversal by peptides containing the Arg-Gly-Asp (RGD) motif. *Physiologia plantarum* **114**, 601–607.
- Díaz-Sala C, Hutchison KW, Goldfarb B, Greenwood MS.** 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: The role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiologia Plantarum* **97**, 481–490.
- Díaz-Sala C, Rey M, Rodríguez R.** 1990. Recovery of transient juvenile capacities during micropropagation of filbert. In: Rodríguez R, Tamés RS, Durzan DJ. Eds. *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*. Plenum Press, New York, 27–36.
- Diskin M, Steiner KC, Hebard FV.** 2006. Recovery of American chestnut characteristics following hybridization and backcross breeding to restore blight-ravaged *Castanea dentata*. *Forest Ecology and Management* **223**, 439–447.
- Doerner P.** 2000. Root patterning: Does auxin provide positional cues?. *Current Biology* **10**, R201–R203.
- Dokane K, Megre D, Lazdane M, Kondratovics U.** 2014. Does shoot anatomical heterogeneity influence *ex vitro* adventitious root formation in rhododendron microcuttings? *Propagation of Ornamental Plants* **14**, 171–176.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B.** 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71–84.
- Dong N, Wang Q, Zhang J, Pei D.** 2011. Immunohistochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of adventitious root formation from cotyledon explants of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **136**, 315–319.
- Druart P, Kevers C, Boxus P, Gaspar T.** 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **108**, 429–436.
- Đurković J, Bukovská J.** 2009. Adventitious rooting performance in micropropagated *Cornus mas*. *Biologia Plantarum* **53**, 715–718.
- E ZG, Ge L, Wang L.** 2012. Molecular mechanism of adventitious root formation in rice. *Plant Growth Regulation* **68**, 325–331.
- Eckenwalder JE.** 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley TM. Eds. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press Ottawa, Ontario, Canada, 7–32.
- Ellis RH.** 1991. The longevity of seeds. *HortScience* **26**, 1119–1125.
- El-Sharkawy I, Sherif S, Mila I, Bouzayen M, Jayasankar S.** 2009. Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* **60**, 907–922.
- Falasca G, Zaghi D, Possenti M, Altamura MM.** 2004. Adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers. *Plant cell reports* **23**, 17–25.
- Farmer Jr RE.** 1970. Genetic variation among open-pollinated progeny of eastern cottonwood. *Silvae Genetica* **19**, 149–151.

- Farquharson KL.** 2010. Gibberellin-auxin crosstalk modulates lateral root formation. *The Plant cell* **22**, 540.
- Feldwisch J, Zettl R, Hesse F, Schell J, Palme K.** 1992. An auxin-binding protein is localized to the plasma membrane of maize coleoptile cells: Identification by photoaffinity labeling and purification of a 23-kDa polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 475–479.
- Fernández J, Pereira S, Miranda E.** 1993. Selección, identificación y esquema de producción de clones híbridos de *C. sativa* Mill. y *C. crenata* Sieb. et Zucc. o *C. mollissima* Blume para producción de madera o fruto. Congreso forestal español, Lourizán, 95–100.
- Fernández J, Pereira S, Miranda E, Vázquez R.** 1997. Conservación, selección y mejora de castaño en el centro de investigaciones forestales de Lourizán. Cuadernos de la SECF **5**, 51–56.
- Fernández-Lorenzo JL, Ballester A, Rigueiro A.** 2005. Phenolic content of microcuttings of adult chestnut along rooting induction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **83**, 153–159.
- Fernández-Lorenzo J, Rigueiro A, Ballester A.** 1999. Polyphenols as potential markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiology* **19**, 461–466.
- Fett-Neto AG, Fett JP, Vieira Goulart LW, Pasquali G, Termignoni RR, Ferreira AG.** 2001. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree physiology* **21**, 457–464.
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L.** 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Molecular genetics and Genomics* **206**, 192–199.
- Fischer JJ, Beatty PH, Good AG, Muench DG.** 2013. Manipulation of MicroRNA expression to improve nitrogen use efficiency. *Plant Science* **210**, 70–81.
- Flathman PE, Lanza GR.** 1998. Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *Journal of soil contamination* **7**, 415–432.
- Fode B, Siemsen T, Thurow C, Weigel R, Gatz C.** 2008. The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *The Plant Cell* **20**, 3122–3135.
- Fogaça CM, Fett-Neto AG.** 2005. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regulation* **45**, 1–10.
- Fortanier EJ, Jonkers H.** 1976. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetical and physiological ageing. *ActaHorticulturae Symposium on Juvenility in Woody Perennials* **56**.37–44.
- Fraga MF, Rodríguez R, Cañal MJ.** 2002. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree physiology* **22**, 813–816.
- Frewen BE, Chen THH, Howe GT, Davis J, Rohde A, Boerjan W, Bradshaw Jr HD.** 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics* **154**, 837–845.
- Friml J.** 2003. Auxin transport - shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 7–12.
- Friml J, Palme K.** 2002. Polar auxin transport—old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology*. **49**, 273–284.
- Fu J, Yu H, Li X, Xiao J, Wang S.** 2011. Rice *GH3* gene family. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 570–574.
- Fujita H, Syono K.** 1996. Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* **37**, 1094–1101.
- Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P.** 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* **10**, 542–549.
- Gahan PB.** 2007. Chapter 1 Totipotency and the cell cycle. In: Jain SM, Häggman H. Eds. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* 3–14.



- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B.** 2007. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* **449**, 1053–1057.
- Gallagher KL, Benfey PN.** 2009. Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement. *The Plant Journal* **57**, 785–797.
- Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R.** 2004. WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & Development* **18**, 375–380.
- Gallois JL, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R.** 2002. Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 3207–3217.
- Gamas P, Niebel FDC, Lescure N, Cullimore JV.** 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Molecular plant-microbe interactions* **9**, 233–242.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* **50**, 151–158.
- Gao MJ, Parkin IAP, Lydiate DJ, Hannoufa A.** 2004. An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. *Plant molecular biology* **55**, 417–431.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe TA.** 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **32**, 272–289.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A.** 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM. *The Proteomics Protocols Handbook*. Eds. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 571–607.
- Geiss G, Gutierrez L, Bellini C.** 2009. Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: Beeckman T. Eds. *Annual Plant Reviews, Root Development*. Blackwell Publishing Ltd. New Delhi, India **37**, 127–156.
- Geldner N, Richter S, Vieten A, Marquardt S, Torres-Ruiz RA, Mayer U, Jürgens G.** 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development* **131**, 389–400.
- Geneve RL, Hackett WP, Swanson BT.** 1989. Root initiation in debladed petioles from juvenile and mature English ivy in response to inhibitors of ethylene biosynthesis and action. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**, 128–131.
- Geneve RL, Kester ST.** 1991. Polyamines and adventitious root formation in the juvenile and mature phase of English ivy. *Journal of experimental botany* **42**, 71–75.
- Ghose K, Selvaraj K, McCallum J, Kirby CW, Sweeney-Nixon M, Cloutier SJ, Deyholos M, Datla R, Fofana B.** 2014. Identification and functional characterization of a flax UDP-glycosyltransferase glucosylating secoisolariciresinol (SECO) into secoisolariciresinol monoglucoside (SMG) and diglucoside (SDG). *BioMed Central, plant biology* **14**, 82.
- Gil B, Pastoriza E, Ballester A, Sánchez C.** 2003. Isolation and characterization of a cDNA from *Quercus robur* differentially expressed in juvenile-like and mature shoots. *Tree physiology* **23**, 633–640.
- Giovannelli A, Rinaldi LMR.** 2009. Setting a model to study *in vitro* rooting of chestnut: Main insights on adventitious root development. In: Niemi K, Scagel C. Eds. *Adventitious Rooting of Forest Trees and Horticultural Plants-From genes to Applications*. Research Singpost, Kerala, India, 259–275.
- Goldfarb B, Lanz-Garcia C, Lian Z, Whetten R.** 2003. Aux/IAA gene family is conserved in the gymnosperm, loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree physiology* **23**, 1181–1192.
- Gonçalves J, Diogo G, Amâncio S.** 1998. *In vitro* propagatopm of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia horticulturae* **72**, 265–275.

- Gong X, Flores-Vergara MA, Hong JH, Chu H, Lim J, Franks RG, Liu Z, Xu J.** 2016. SEUSS integrates gibberellin signaling with transcriptional inputs from the SHR-SCR-SCL3 module to regulate middle cortex formation in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiology* **170**, 1675-1683.
- González, M.L.** 1981. Fenómenos de histogénesis y organogénesis en explantos de cotiledón de castaña cultivados “*in vitro*”. Ph.D. Thesis. Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
- González MV, Cuenca B, López M, Prado MJ, Rey M.** 2011. Molecular characterization of chestnut plants selected for putative resistance to *Phytophthora cinnamomi* using SSR markers. *Scientia horticulturae* **130**, 459-467.
- Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB.** 2010. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *The Plant cell* **22**, 623-639.
- Greenwood MS.** 1987. Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* **6**, 1-12.
- Greenwood MS.** 1995. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree physiology* **15**, 433-438.
- Greenwood MS, Cui X, Xu F.** 2001. Response to auxin changes during maturation-related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (*Pinus taeda*) stem cuttings. *Physiologia plantarum* **111**, 373-380.
- Greenwood MS, Hopper CA, Hutchison KW.** 1989. Maturation in larch I. Effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. *Plant Physiology* **90**, 406-412.
- Greenwood MS, Hutchison KW.** 1993. Maturation as a developmental process. In: Ahuja MR, Libby WJ. Eds. *Clonal Forestry I*. Springer Berlin Heidelberg, 14-33.
- Greenwood MS, Singer PB, Decker A, Hutchison KW, Díaz-Sala C.** 1997. Differential gene expression during maturation-caused decline in adventitious rooting ability in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In: Altman A, Waisel Y. Eds. *Biology of Root Formation and Development*. Springer US **65**, 203-208.
- Greenwood MS, Weir RJ.** 1995. Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyl cuttings. *Tree physiology* **15**, 41-45.
- Gresshoff PM, Doy CH.** 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* **107**, 161-170.
- Grones P, Friml J.** 2015. Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science* **128**, 1-7.
- Grönroos L, Kubát B, Von Arnold S, Eliasson L.** 1989. Cytokinin contents in shoot cultures of four *Salix* clones. *Journal of plant physiology* **135**, 150-154.
- Guan L, Murphy AS, Peer WA, Gan L, Li Y, Cheng ZM (Max).** 2015. Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 506-521.
- Guilfoyle TJ, Hagen G.** 2007. Auxin response factors. *Current opinion in plant biology* **10**, 453-460.
- Gürel E, Wren MJ.** 1995. *In vitro* development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Rhizogenesis and the effect of sequential exposure to auxin and cytokinin. *Annals of botany* **75**, 31-38.
- Gutierrez L, Bussell JD, Păcurar DI, Schwambach J, Păcurar M, Bellini C.** 2009. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant cell* **21**, 3119-3132.
- Hackett WP.** 1985. Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. *Horticultural Reviews* **7**, 109-155.
- Hackett WP.** 1987. Juvenility and maturity. In: Bonga JM, Durzan DJ. Eds. *Cell and tissue culture in forestry*. Springer Netherlands, 216-231.

- Hackett WP, Murray JR.** 1993. Maturation and rejuvenation in woody species. In: Ahuja MR. Eds. Micropropagation of woody plants. Springer Netherlands **41**, 93–105.
- Haffner V, Enjalric F, Lardet L, Carron MP.** 1991. Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. *Annals of Forest Science* **48**, 615–630.
- Hagen G, Guilfoyle TJ.** 1985. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and cellular biology* **5**, 1197–1203.
- Hamann A.** 1998. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. *Trees* **12**, 175–180.
- Han KH, Meilan R, Ma C, Strauss SH.** 2000. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*) transformation of several economically important. *Plant Cell Reports* **19**, 315–320.
- Hao Y, Cui H.** 2012. SHORT-ROOT regulates vascular patterning, but not apical meristematic activity in the *Arabidopsis* root through cytokinin homeostasis. *Plant signaling & behavior* **7**, 314–317.
- Hao D, Ma P, Mu J, Chen S, Xiao P, Peng Y, Huo L, Xu L, Sun C.** 2012. *De novo* characterization of the root transcriptome of a traditional Chinese medicinal plant *Polygonum cuspidatum*. *Science China Life Sciences* **55**, 452–466.
- Harbage JF, Stimart DP.** 1996a. Ethylene does not promote adventitious root initiation on apple microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 880–885.
- Harbage JF, Stimart DP.** 1996b. Effect of pH and <sup>1</sup>H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**, 1049–1053.
- Hasbún R, Valledor L, Berdasco M, Santamaría E, Cañal MJ, Rodríguez R, Rios D, Sánchez M.** 2005. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. *Acta horticulturae* **693**, 333–340.
- Hebard F V.** 2005. The backcross breeding program of the American chestnut foundation. *Journal of the American Chestnut Foundation* **19**, 55–77.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG.** 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733–736.
- Heidstra R, Welch D, Scheres B.** 2004. Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes & Development* **18**, 1964–1969.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN.** 2000. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**, 555–567.
- Heller R.** 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Annales de Sciences Naturelles, de Botanique et de Biologie Végétale*, **14**, 1–223.
- Heller G, Lundén K, Finlay RD, Asiegbu FO, Elfstrand M.** 2012. Expression analysis of *Clavata1-like* and *Nodulin21-like* genes from *Pinus sylvestris* during ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* **22**, 271–277.
- Heloir MC, Kevers C, Hausman JF, Gaspar T.** 1996. Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of *in-vitro*-propagated walnut shoots. *Tree physiology* **16**, 515–519.
- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inzé D.** 1993. cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell* **5**, 1711–1723.
- Heo JO, Chang KS, Kim IA, Lee MH, Lee SA, Song SK, Lee MM, Lim J.** 2011. Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **108**, 2166–2171.

- Hirota A, Kato T, Fukaki H, Aida M, Tasaka M.** 2007. The auxin-regulated AP2/EREBP gene *PUCHI* is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**, 2156–2168.
- Hirsch AM, Bhuvaneswari TV, Torrey JG, Bisseling T.** 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **86**, 1244–1248.
- Husen A.** 2012. Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. *American Journal of Plant Physiology* **7**, 1–16.
- Husen A, Pal M.** 2006. Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cuttings in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New Forests* **31**, 57–73.
- Hussein S. Ling APK, NG TH, Ibrahim R, Peak KY.** 2012. Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant, *Eurycoma longifolia*. *Romanian Biotechnological Letters* **17**, 7026–7035.
- Hutchinson JF.** 1984. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple ‘Northern Spy’. *Scientia Horticulturae* **22**, 347–358.
- Hutchison KW, Sherman CD, Weber J, Smith SS, Singer PB, Greenwood MS.** 1990. Maturation in larch II. Effects of age on photosynthesis and gene expression in developing foliage. *Plant Physiology* **94**, 1308–1315.
- Hutchison KW, Singer PB, McInnis S, Díaz-Sala C, Greenwood MS.** 1999. Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin. *Plant Physiology* **120**, 827–831.
- Iacona C, Muleo R.** 2010. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and ex vitro performance of cherry rootstock Colt. *Scientia Horticulturae* **125**, 630–636.
- Imin N, Nizamudin M, Wu T, Rolfe BG.** 2007. Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 439–451.
- Itoh JI, Nonomura KI, Ikeda K, Shinichiro Y, Yamagishi Y, Kitano H, Nagato Y.** 2005. Rice Plant Development: from Zygote to Spikelet. *Plant Cell Physiology* **46**, 23–47.
- Jacquot C.** 1950. The culture in vitro of cambial tissues of *C. sativa*. *Compte Rendu Hebdomadaire des Seances de l’Academie des Sciences* **231**, 1080–1081.
- Jansson S, Douglas CJ.** 2007. *Populus*: A Model System for Plant Biology. *The Annual Review of Plant Biology* **58**, 435–458.
- Jaynes RA.** 1962. Chestnut chromosomes. *Forest Science* **8**, 372–377.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* **6**, 3901–3907.
- Jenifer U, Francina Cecilia K, and Ravindhran R.** 2012. *In vitro* adventitious root and hairy root cultures in *Boerhaavia diffusa* L. *International Journal of Current Research* **4**, 65–67.
- Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C.** 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* **167**, 113–127.
- Kamiya N, Itoh JI, Morikami A, Nagato Y, Matsuoka M.** 2003. The *SCARECROW* gene’s role in asymmetric cell divisions in rice plants. *The Plant Journal* **36**, 45–54.
- Kant S, Bi YM, Rothstein SJ.** 2010. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1499–1509.
- Karlberg A, Bako L, Bhalerao RP.** 2011. Short day-mediated cessation of growth requires the downregulation of AINTEGUMENTALIKE1 transcription factor in hybrid Aspen. *PLoS Genetics* **7**, e1002361.



- Kazan K.** 2013. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of botany* **112**, 1655–1665.
- Kerr ID, Bennett MJ.** 2007. New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *The Biochemical journal* **401**, 613–622.
- Kevers C, Hausman JF, Faivre-Rampant O, Evers D, Gaspar T.** 1997. Hormonal control of adventitious rooting: Progress and questions. *Journal of Applied Botany* **71**, 71–79.
- Keys RN, Cech FC.** 1982. Propagation of American chestnut *in vitro*. In: Smith HC, MacDonald WL. EDS. *Proceeding of the USDA Forest Service American Chestnut Cooperator's Meeting*. Jan 5-7, 1982. Morgantown, WV, USA. 106–110.
- Khan S, Stone JM.** 2007. *Arabidopsis thaliana* *GH3.9* influences primary root growth. *Planta* **226**, 21–34.
- Khorolragchaa A, Kim YJ, Rahimi S, Sukweenadhi J, Jang MG, Yang DC.** 2014. Grouping and characterization of putative glycosyltransferase genes from *Panax ginseng* Meyer. *Gene* **536**, 186–192.
- Kim JY, Henrichs S, Bailly A, Vincenzetti V, Sovero V, Mancuso S, Pollmann S, Kim D, Geisler M, Nam HG.** 2010. Identification of an ABCB/P-glycoprotein-specific inhibitor of auxin transport by chemical genomics. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 23309–23317.
- Kitomi Y, Ito H, Hobo T, Aya K, Kitano H, Inukai Y.** 2011. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRR1*, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *The Plant Journal* **67**, 472–484.
- Kittrell SK, Kester ST, Geneve RL.** 2006. Adventitious root formation in tomato hormone mutants. *Comb. Proc. Intl. Plant Propagator's Soc* **56**, 453–457.
- de Klerk GJ.** 2002. Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **38**, 415–422.
- de Klerk GJ, Hanecakova J.** 2008. Ethylene and rooting of mung bean cuttings. The role of auxin induced ethylene synthesis and phase-dependent effects. *Plant Growth Regulation* **56**, 203–209.
- de Klerk GJ, van der Krieken W, de Jong J.** 1999. Review the formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **35**, 189–199.
- Koizumi K, Gallagher KL.** 2013. Identification of SHRUBBY, a SHORT-ROOT and SCARECROW interacting protein that controls root growth and radial patterning. *Development* **140**, 1292–1300.
- Koizumi K, Hayashi T, Gallagher KL.** 2012a. SCARECROW reinforces SHORT-ROOT signaling and inhibits periclinal cell divisions in the ground tissue by maintaining SHR at high levels in the endodermis. *Plant signaling & behavior* **7**, 1573–1577.
- Koizumi K, Hayashi T, Wu S, Gallagher KL.** 2012b. The SHORT-ROOT protein acts as a mobile, dose- dependent signal in patterning the ground tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 13010–13015.
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L.** 2008. Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiologia plantarum* **133**, 406–416.
- Konieczny R, Kępczyński J, Pilarska M, Cembrowska D, Menzel D, Šamaj J.** 2009. Cytokinin and ethylene affect auxin transport-dependent rhizogenesis in hypocotyls of common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 331–340.
- Konishi M, Sugiyama M.** 2003. Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **130**, 5637–5647.

- Koressaar T, Remm M.** 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289-1291.
- Kouchi H, Hata S.** 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Molecular & general genetics* **238**, 106–119.
- Kouchi H, Takane K, So RB, Ladha JK, Reddy PM.** 1999. Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *The Plant Journal* **18**, 121–129.
- Koukourikou-Petridou MA, Bangerth F.** 1997. Effect of changing the endogenous concentration of auxins and cytokinins and the production of ethylene in pea stem cuttings on adventitious root formation. *Plant Growth Regulation* **22**, 101–108.
- Kumar R, Sangwan RS, Mishra S, Sabir F, Sangwan NS.** 2012. In silico motif diversity analysis of the glycon preferentiality of plant secondary metabolic glycosyltransferases. *Plant OMICS* **5**, 200–210.
- Kurata T, Yamamoto KT.** 1997. Light-stimulated root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **151**, 346–351.
- Kuroha T, Satoh S.** 2007. Involvement of cytokinins in adventitious and lateral root formation. *Plant Root* **1**, 27–33.
- Kyoung M, Goo C, Sup Y, Chung M, Choon B, Sheop J, Myung J.** 2003. Identification of genes possibly related to storage root induction in sweetpotato. *FEBS Letters* **536**, 101-105.
- Laajanen K, Vuorinen I, Salo V, Juuti J, Raudaskoski M.** 2007. Cloning of *Pinus sylvestris* *SCARECROW* gene and its expression pattern in the pine root system, mycorrhiza and NPA-treated short roots. *New Phytologist* **175**, 230–243.
- Lane WD.** 1979. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters* **13**, 281–285.
- Lang P, Dane F, Kubisiak TL.** 2006. Phylogeny of *Castanea* (Fagaceae) based on chloroplast trnT-L-F sequence data. *Tree Genetics & Genomes* **2**, 132–139.
- Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Colette A, Hogeweg P, Marée AFM, Scheres B.** 2008. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology* **6**, e307.
- di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN.** 1996. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**, 423–433.
- Lee JH, Kim DM, Lee JH, Kim J, Bang JW, Kim WT, Pai HS.** 2005. Functional characterization of NtCEF1, an AP2/EREBP-type transcriptional activator highly expressed in tobacco callus. *Planta* **222**, 211–224.
- Lee MH, Kim B, Song SK, Heo JO, Yu NI, Lee SA, Kim M, Kim DG, Sohn SO, Lim CE, Chang KS, Lee MM, Lim J.** 2008. Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **67**, 659–670.
- Lee YS, Yang T, Park S, Baek JH, Wu S, Lim K.** 2011. Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin. *Plant Omics Journal* **4**, 190–194.
- Legué V, Rigal A, Bhalerao RP.** 2014. Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors. *Physiologia plantarum* **151**, 192–198.
- Lehman A, Black R, Ecker JR.** 1996. HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell* **85**, 183–194.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S.** 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* **30**, 325–327.



- Levesque MP, Vernoux T, Busch W, Cui H, Wang JY, Blilou I, Hassan H, Nakajima K, Matsumoto N, Lohmann JU, Scheres B, Benfey PN.** 2006. Whole-genome analysis of the short-root developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* **4**, 739–752.
- Li Y, Li P, Wang Y, Dong R, Yu H, Hou B.** 2014. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of Family-1 UDP glycosyltransferases in maize (*Zea mays*). *Planta* **239**, 1265–1279.
- Li L, Modolo LV, Escamilla-Trevino LL, Achnine L, Dixon RA, Wang X.** 2007. Crystal Structure of *Medicago truncatula* UGT85H2 - Insights into the Structural Basis of a Multifunctional (Iso)flavonoid Glycosyltransferase. *Journal of Molecular Biology* **370**, 951–963.
- Li S, Shi R, Leng Y, Zhou Y.** 2016. Transcriptomic analysis reveals the gene expression profile that specifically responds to IBA during adventitious rooting in mung bean seedlings. *BioMed Central Genomics* **17**, 1–23.
- Li S, Xue L, Xu S, feng H, An L.** 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The botanical Review* **75**, 230–247.
- Libault M, Joshi T, Takahashi K, Hurley-Sommer A, Puricelli K, Blake S, Finger RE, Taylor CG, Xu D, Nguyen HT, Stacey G.** 2009. Large-scale analysis of putative soybean regulatory gene expression identifies a *Myb* gene involved in soybean nodule development. *Plant Physiology* **151**, 1207–1220.
- Lim J, Helariutta Y, Specht CD, Jung J, Sims L, Bruce WB, Diehn S, Benfey PN.** 2000. Molecular Analysis of the *SCARECROW* Gene in Maize Reveals a Common Basis for Radial Patterning in Diverse Meristems. *The Plant Cell* **12**, 1307–1318.
- Lim J, Jung JW, Lim CE, Lee MH, Kim BJ, Kim M, Bruce WB, Benfey PN.** 2005. Conservation and diversification of *SCARECROW* in maize. *Plant molecular biology* **59**, 619–630.
- Lima JE, Benedito VA, Figueira A, Peres LEP.** 2009. Callus, shoot and hairy root formation *in vitro* as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. *Plant Cell Reports* **28**, 1169–1177.
- Ling APK, Tan KP, Hussein S.** 2013. Comparative effects of plant growth regulators on leaf and stem explants of *Labisia pumila* var. *alata*. *Journal of Zhejiang University-Science B* **14**, 621–631.
- Linsmaier EM, Skoog F.** 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **18**, 100–127.
- Liu K, Kang BC, Jiang H, Moore SL, Li H, Watkins CB, Setter TL, Jahn MM.** 2005. A *GH3*-like gene, *CcGH3*, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Molecular Biology* **58**, 447–464.
- Liu J, Li J, Wang H, Fu Z, Liu J, Yu Y.** 2011. Identification and expression analysis of ERF transcription factor genes in petunia during flower senescence and in response to hormone treatments. *Journal of Experimental Botany* **62**, 825–840.
- Liu J, Sheng L, Xu Y, Li J, Yang Z, Huang H, Xu L.** 2014a. *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 1081–1093.
- Liu B, Wang L, Zhang J, Li J, Zheng H, Chen J, Lu M.** 2014b. *WUSCHEL*-related *Homeobox* genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation. *BioMed Central Genomics* **15**, 296.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G.** 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**, 465–474.
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G.** 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **17**, 1090–1104.
- Lloyd G, McCown B.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagation Society* **30**, 421–427.

**Lucas M, Swarup R, Paponov IA, Swarup K, Casimiro I, Lake D, Peret B, Zappala S, Mairhofer S, Whitworth M, Wang J, Ljung K, Marchant A, Sandberg G, Holdsworth MJ, Palme K, Pridmore T, Mooney S, Bennett MJ.** 2011. Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **155**, 384–398.

**Ludwig-Müller J.** 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1757–1773.

**Ludwig-Müller J, Vertocnik A, Town CD.** 2005. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of experimental botany* **56**, 2095–2105.

**Luschnig C.** 2001. Auxin transport: why plants like to think BIG. *Current Biology* **11**, R831–R833.

**Mantiri FR, Kurdyukov S, Lohar DP, Sharopova N, Saeed NA, Wang X-D, Vandenbosch KA, Rose RJ.** 2008. The transcription factor *MtSERF1* of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **146**, 1622–1636.

**Manzanera JA, Pardos JA.** 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**, 1–8.

**Marum L, Miguel A, Ricardo CP, Miguel C.** 2012. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Quercus suber*. *PloS ONE* **7**, e35113.

**Mauriat M, Petterle A, Bellini C, Moritz T.** 2014. Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and *Arabidopsis* by affecting auxin transport. *The Plant Journal* **78**, 372–384.

**Mauriat M, Sandberg LG, Moritz T.** 2011. Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen. *The Plant Journal* **67**, 805–816.

**Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T.** 1998. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805–815.

**Maynard CA, Powell WA, Polin-McGuigan LD, Viéitez AM, Ballester A, Corredoira E, Merkle SA, Andrade GM.** 2008. Chestnut. In: Kole C, Hall TC. Eds. *Compendium of transgenic crop plants: Forest Tree Species*. Blackwell Publishing Ltd. New Delhi, India **9**, 169-192.

**Mayrose M, Ekengren SK, Melech-Bonfil S, Martin GB, Sessa G.** 2006. A novel link between tomato GRAS genes, plant disease resistance and mechanical stress response. *Molecular Plant Pathology* **7**, 593–604.

**McCown BH, Lloyd G.** 1981. Woody plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. *Horticultural Science* **16**, 453.

**McDonald MP, Visser EJW.** 2003. A study of the interaction between auxin and ethylene in wild type and transgenic ethylene-insensitive tobacco during adventitious root formation induced by stagnant root zone conditions. *Plant biology* **5**, 550–556.

**Mehrnia M, Balazadeh S, Zanol MI, Mueller-Roeber B.** 2013. EBE, an AP2/ERF transcription factor highly expressed in proliferating cells, affects shoot architecture in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **162**, 842–857.

**Middleton AM, Ubeda-Tomas S, Griffiths J, Holman T, Hedden P, Thomas, SG, Phillips AL, Holdsworth MJ, Bennett MJ, King JR, Owen MR.** 2012. Mathematical modeling elucidates the role of transcriptional feedback in gibberellin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 7571–7576.

**Miguel C, Marum L.** 2011. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3713–3725.

**Miklashevichs E, Röhrig H, Schell J, Schmidt J.** 2001. Perception and signal transduction of rhizobial NOD factors. *Critical Reviews in Plant Sciences* **20**, 373–394.

- Minibayeva F, Beckett RP, Kranner I.** 2015. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry* **112**, 122–129.
- Mockaitis K, Estelle M.** 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**, 55–80.
- Morohashi K, Minami M, Takase H, Hotta Y, Hiratsuka K.** 2003. Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20865–20873.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S.** 2010. The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology* **20**, 1138–1143.
- Muday GK, DeLong A.** 2001. Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in plant science* **6**, 535–542.
- Muday GK, Murphy AS.** 2002. An emerging model of auxin transport regulation. *The Plant cell* **14**, 293–299.
- Mulin M, Pais MS, da Costa Seabra R.** 1999. Induction of adventitious shoots from internodal longitudinal sections of *Castanea sativa* Mill. *Acta Horticulture* **494**, 255–260.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473–497.
- Murray JR, Hackett WP.** 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant physiology* **97**, 343–351.
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T.** 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* **7**, 869–885.
- Nagashima A, Uehara Y, Sakai T.** 2008. The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 is involved in the inhibitory effects of N-1-naphthylphthalamic acid on the phototropic and gravitropic responses of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1250–1255.
- Nagawa S, Xu T, Lin D, Dhonukshe P, Zhang X, Friml J, Scheres B, Fu Y, Yang Z.** 2012. ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Biology* **10**, e1001299.
- Naija S, Elloumi N, Jbir N, Ammar S, Kevers C.** 2008. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 518–525.
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M.** 2001. *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *The Plant Journal* **25**, 213–221.
- Nandagopal S, Kumari BDR.** 2007. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. *Journal of Central european Agriculture* **8**, 73–80.
- Negishi N, Nakahama K, Urata N, Kojima M, Sakakibara H, Kawaoka A.** 2014. Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. *New Forests* **45**, 577–587.
- Newcombe G.** 1996. The specificity of fungal pathogens of *Populus*. In: Stettler R, Bradshaw T, Heilman O, Hinckley T. Eds. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada, 223–241.
- Niu S, Li Z, Yuan H, Fang P, Chen X, Li W.** 2013. Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to regulate adventitious root development in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3411–3424.
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ.** 2003. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant physiology* **133**, 218–230.

- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ.** 2009. Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1759–1771.
- Nole-Wilson S, Tranby TL, Krizek BA.** 2005. *AINTEGUMENTA-like (AIL)* genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Molecular Biology* **57**, 613–628.
- Nordström AC, Jacobs FA, Eliasson L.** 1991. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology* **96**, 856–861.
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Dolezal K, Sandberg G.** 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8039–8044.
- Okoro OO, Grace J.** 1978. The physiology of rooting *Populus* cuttings. *Physiologia Plantarum* **36**, 133–138.
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A.** 2005. Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *The Plant Cell* **17**, 444–463.
- Oldroyd GED, Downie JA.** 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Reviews. Plant Biology* **59**, 519–546.
- Olszewski N, Sun T, Gubler F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell* **14**, S61–S80.
- Orlovic S, Guzina V, Krstic B, Merkulov L.** 1998. Genetic variability in anatomical, physiological and growth characteristics of hybrid poplar (*Populus x euramericana* Dode (Guinier)) and eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) clones. *Silvae genetica* **47**, 183–190.
- Osmani SA, Bak S, Möller BL.** 2009. Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* **70**, 325–347.
- Ostrowski M, Jakubowska A.** 2013. *GH3* expression and IAA-amide synthetase activity in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings are regulated by light, plant hormones and auxinic herbicides. *Journal of Plant Physiology* **170**, 361–368.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T.** 2010. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology* **2**, a001537.
- Paciorek T, Zažímalová E, Ruthardt N, Petrášek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jürgens G, Geldner N, Friml J.** 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* **435**, 1251–1256.
- Panaia M, Senaratna T, Bunn E, Dixon KW, Sivasithamparam K.** 2000. Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**, 23–29.
- Papadopoulos K, Roussis A, Katinakis P.** 1996. *Phaseolus* ENOD40 is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenetic processes: expression during nodule and lateral root development. *Plant Molecular Biology* **30**, 403–417.
- Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JAH, Palme K.** 2008. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **1**, 321–337.
- Paquette S, Moller BL, Bak S.** 2003. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* **62**, 399–413.



- Parizot B, Beeckman T.** 2013. Genomics of root development. In: Crespi M. Eds. Root Genomics and Soil Interactions. John Wiley & Sons, Inc, 3-28.
- Park JE, Kim YS, Yoon HK, Park CM.** 2007. Functional characterization of a *small auxin-up* RNA gene in apical hook development in *Arabidopsis*. Plant Science **172**, 150–157.
- Park YS, Bonga J, McCartney A, Adams G.** 2014. Integration of tree biotechnologies into multi-varietal forestry. In: Park YS, Bonga JM. Eds. Proceeding of the third international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on "Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies." September 8-12, 2014. Vitoria-Gasteiz, Spain, 95-97.
- Parry G, Estelle M.** 2006. Auxin receptors: a new role for F-box proteins. Current opinion in cell biology **18**, 152–156.
- Patrick B, Antonin L, Servane LL, Deleu C, Le Deunff E.** 2009. Ethylene modifies architecture of root system in response to stomatal opening and water allocation changes between root and shoot. Plant signaling behavior **4**, 44–46.
- Pawlowski K, Twigg P, Dobritsa S, Guan C, Mullin BC.** 1997. A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development. Molecular plant-microbe interactions **10**, 656–664.
- Peat TS, Böttcher C, Newman J, Lucent D, Cowieson N, Davies C.** 2012. Crystal structure of an indole-3-acetic acid amido synthetase from grapevine involved in auxin homeostasis. The Plant cell **24**, 4525–4538.
- Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H, Murphy AS.** 2011. Seven things we think we know about auxin transport. Molecular Plant **4**, 487–504.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP.** 1997. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes & Development **11**, 3194–3205.
- Pereira-Lorenzo S, Ballester A, Corredoira E, Viéitez AM, Agnanostakis S, Costa R, Bounous G, Botta R, Beccaro GL, Kubisiak TL, Conedera M, Krebs P, Yamamoto T, Sawamura Y, Takada N, Gomes-Laranjo J, Ramos-Cabrera AM.** 2012. Chestnut. In: Badenes ML, Byrne DH. Eds. Handbook of Plant Breeding. Fruit Breeding. Springer US, **19**, 729–769.
- Pernas M, Sánchez-Monge R, Gómez L, Salcedo G.** 1998. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. Plant molecular biology **38**, 1235–1242.
- Pernas M, Sánchez-Monge R, Salcedo G.** 2000. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. FEBS Letters **467**, 206–210.
- Pfluger J, Wagner D.** 2007. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. Current Opinion in Plant Biology **10**, 645–652.
- Piagnani C, Zocchi G, Mignani I.** 1996. Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis. Plant Science **118**, 89–95.
- Pijut PM, Woeste KE, Michler CH.** 2011. 6 Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. In: Paris HS, Nybom H, Cantliffe D. Horticultural Reviews. Wiley-Blackwell **38**, 213-252.
- Plata E, Ballester A, Viéitez AM.** 1991. An anatomical study of secondary embryogenesis in *Camellia reticulata*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant **27**, 183–189.
- Poethig RS.** 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. Science **250**, 923-950.
- Poethig RS.** 2003. Phase change and the regulation of developmental timing in plants. Science **301**, 334–336.

- Pop TI, Pamfil D, Bellini C.** 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **39**, 307–316.
- Porth I, Koch M, Berenyi M, Burg A, Burg K.** 2005. Identification of adaptation-specific differences in mRNA expression of sessile and pedunculate oak based on osmotic-stress-induced genes. *Tree physiology* **25**, 1317–1329.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN.** 1999. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant journal* **18**, 111–119.
- Quave CL, Lyles JT, Kavanaugh JS, Nelson K, Parlet CP, Crosby HA, Heilmann KP, Horswill AR.** 2015. *Castanea sativa* (European chestnut) leaf extracts rich in ursene and oleanene derivatives block *Staphylococcus aureus* virulence and pathogenesis without detectable resistance. *PloS ONE* **10**, e0136486.
- Quint M, Gray WM.** 2006. Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 448–453.
- Quintana J, Contreras A, Merino I, Vinuesa A, Orozco G, Ovalle F, Gomez L.** 2015. Genetic characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) orchards and traditional nut varieties in El Bierzo, a glacial refuge and major cultivation site in northwestern Spain. *Tree Genetics & Genomes* **11**, 1–12.
- Quoirin M, Lepoivre P.** 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae* **78**, 437–442.
- Ragonezi C, Castro MR, Klimaszcwska K, Lima M, Zavattieri MA.** 2010. Influence of light quality and intensity on adventitious root formation in microshoots of *Pinus pinea* L. *Acta Horticulturae* **865**, 287–291.
- Rahman A, Bannigan A, Sulaman W, Pechter P, Blancaflor EB, Baskin TI.** 2007. Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *The Plant Journal* **50**, 514–528.
- Ramírez-Carvajal GA, Morse AM, Dervinis C, Davis JM.** 2009. The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. *Plant physiology* **150**, 759–771.
- Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK.** 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**, 481–490.
- Rashotte AM, Chae HS, Maxwell BB, Kieber JJ.** 2005. The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia Plantarum* **123**, 184–194.
- Rashotte AM, DeLong A, Muday GK.** 2001. Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *The Plant cell* **13**, 1683–1697.
- Rashotte AM, Poupart J, Waddell CS, Muday GK.** 2003. Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis* **133**, 761–772.
- Rasmussen A, Hosseini SA, Hajirezaei MR, Druege U, Geelen D.** 2015. Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. *Journal of experimental botany* **66**, 1437–1452.
- Rasmussen A, Hunt MA.** 2010. Ageing delays the cellular stages of adventitious root formation in pine. *Australian Forestry* **73**, 41–46.
- Reddy PM, Kouchi H, Ladha JK.** 1998. Isolation, analysis and expression of homologues of the soybean early nodulin gene *GmENOD93* (*GmN93*) from rice. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1443**, 386–392.
- Reed RC, Brady SR, Muday GK.** 1998. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **118**, 1369–1378.
- Reverberi M, Falasca G, Altamura MM, Lauri P, Caboni E.** 2001. Indoleacetic acid induces xylem formation instead of rooting in walnut (*Juglans regia* L.) microcuttings. *Plant Biosystems* **135**, 71–77.



- Reynolds JF.** 1986. Regeneration in vegetable species. *Cell culture and somatic cell genetics of plants* **3**, 151–178.
- Ricci A, Rolli E, Dramis L, Díaz-Sala C.** 2008. N,N'-bis-(2,3-Methylenedioxyphenyl) urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl)urea enhance adventitious rooting in *Pinus radiata* and affect expression of genes induced during adventitious rooting in the presence of exogenous auxin. *Plant Science* **175**, 356–363.
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harberd NP.** 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 67–88.
- Richards DE, Peng J, Harberd NP.** 2000. Plant GRAS and metazoan STATs: One family? *BioEssays* **22**, 573–577.
- Rigal A, Yordanov YS, Perrone I, Karlberg A, Tisserant E, Bellini C, Busov VB, Martin F, Kohler A, Bhalerao R, Legué V.** 2012. The *AINTEGUMENTA LIKE1* homeotic transcription factor *PtAIL1* controls the formation of adventitious root primordia in poplar. *Plant Physiology* **160**, 1996–2006.
- Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S, Zhang J, Simon S, Čovanová M, Hayashi K, Dhonukshe P, Yang Z, Bednarek SY, Jones AM, Luschnig C, Aniento F, Zažímalová E, Friml J.** 2010. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 111–121.
- Rodríguez L, Cuenca B, Pato B, Cámara MJ, Ocaña L.** 2005. Producción *in vitro* y mediante estaquillado semiherbáceo de híbridos de castaño en un vivero comercial: Coste y eficiencia de ambos sistemas. IV Congreso Forestale Español.
- Rojas-Pierce M, Titapiwatanakun B, Sohn EJ, Fang F, Larive CK, Blakeslee J, Cheng Y, Cuttler S, Peer WA, Murphy AS, Raikhel NV.** 2007. *Arabidopsis* P-glycoprotein19 participates in the inhibition of gravitropism by gravacin. *Chemistry & biology* **14**, 1366–1376.
- Rose RJ, Wang XD, Nolan KE, Rolfe BG.** 2006. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. *Journal of experimental botany* **57**, 2227–2235.
- Ross J, Li Y, Lim E, Bowles DJ.** 2001. Higher plant glycosyltransferases. *Genome biology* **2**, Reviews3004.
- Roux C, Perrot-Rechenmann C.** 1997. Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA *Nt-gh3*, related to *GH3*. *FEBS Letters* **419**, 131–136.
- Rozov SM, Zagorskaya AA, Deineko EV, Shumny VK.** 2013. Auxin: regulation and its modulation pathways. *Biology Bulletin Reviews* **3**, 423–430.
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M.** 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Development* **12**, 198–207.
- Ruegger M, Dewey E, Hobbie L, Brown D, Bernasconi P, Turner J, Muday G, Estelle M.** 1997. Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *The Plant Cell* **9**, 745–757.
- Růžicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, Friml J, Benková E.** 2007. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* **19**, 2197–2212.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B.** 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & development* **17**, 354–358.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2006. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **18**, 1292–1309.

- San José MC, Ballester A, Viéitez AM.** 1988. Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. Tree physiology **4**, 281–290.
- San José MC, Valladares S, Janeiro LV, Corredoira E.** 2014. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Acta physiologiae plantarum **36**, 109–116.
- San José MC, Viéitez AM, Viéitez E.** 1984. *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. Journal of horticultural science **59**, 359–365.
- San José MC, Viéitez AM.** 1993. Regeneration of *Camellia* plantlets from leaf explant cultures by embryogenesis and caulogenesis. Scientia horticultrae **54**, 303–315.
- Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M.** 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. Annual review of plant biology **42**, 507–528.
- Sánchez MC, Ballester A, Viéitez AM.** 1997a. Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. Annales of Forest Science **54**, 359–370.
- Sánchez MC, San José MC, Ballester A, Viéitez AM.** 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. Tree physiology **16**, 673–680.
- Sánchez MC, San José MC, Ferro E, Ballester A, Viéitez AM.** 1997b. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. Journal of Horticultural Science **72**, 433–443.
- Sánchez MC, Smith AG, Hackett WP.** 1995. Localized expression of a proline-rich protein gene in juvenile and mature ivy petioles in relation to rooting competence. Physiologia Plantarum **93**, 207–216.
- Sánchez MC, Viéitez AM.** 1991. *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. Tree physiology **8**, 59–70.
- Sánchez MC, Vielba JM, Ferro E, Covelo G, Solé A, Abarca D, de Mier BS, Díaz-Sala C.** 2007. Two *SCARECROW-LIKE* genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. Tree physiology **27**, 1459–1470.
- Santamaría ME, Hasbún R, Valera MJ, Meijón M, Valledor L, Rodríguez JL, Toorop PE, Cañal MJ, Rodríguez R.** 2009. Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. Journal of Plant Physiology **166**, 1360–1369.
- Santamaría ME, Rodríguez R, Cañal MJ, Toorop PE.** 2011. Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. Annals of Botany **108**, 485–498.
- Sassa N, Matsushita Y, Nakamura T, Nyunoya H.** 2001. The molecular characterization and *in situ* expression pattern of pea *SCARECROW* gene. Plant and cell physiology **42**, 385–394.
- Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J.** 2013. Auxin: simply complicated. Journal of Experimental Botany **64**, 2565–2577.
- Savona M, Mattioli R, Nigro S, Falasca G, Della Rovere F, Costantino P, De Vries S, Ruffoni B, Trovato M, Altamura MM.** 2012. Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. Journal of Experimental Botany **63**, 471–488.
- Sbabou L, Bucciarelli B, Miller S, Liu J, Berhada F, Filali-Maltouf A, Allan D, Vance C.** 2010. Molecular analysis of *SCARECROW* genes expressed in white lupin cluster roots. Journal of experimental botany **61**, 1351–1363.
- Schafleitner R, Wilhelm E.** 2002. Isolation of wound-responsive genes from chestnut (*Castanea sativa*) microstems by mRNA display and their differential expression upon wounding and infection with the chestnut blight fungus (*Chryphonectria parasitica*). Physiological and Molecular Plant Pathology **61**, 339–348.
- Schenk RU, Hildebrandt AC.** 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany **50**, 199–204.

- Scherer GFE.** 2011. AUXIN-BINDING-PROTEIN1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction?. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3339–3357.
- Scheres B.** 2007. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 345–354.
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, De Vries SC.** 1997. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**, 2049–2062.
- Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nature protocols* **3**, 1101–1108.
- Schnaubelt D, Queval G, Dong Y, Díaz-Vivancos P, Makgopa ME, Howell G, De Simone A, Bai J, Hannah MA, Foyer CH.** 2015. Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **38**, 266–279.
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E, Berglund A, Nilsson P, Hertzberg M, Sandberg G.** 2004. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *The Plant Cell* **16**, 2278–2292.
- Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K.** 1999. The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 290–295.
- Seabra RC, Pais MS.** 1998. Genetic transformation of European chestnut. *Plant Cell Reports* **17**, 177–182.
- Sebastiana M, Figueiredo A, Acioli B, Sousa L, Pessoa F, Baldé A, Pais MS.** 2009. Identification of plant genes involved on the initial contact between ectomycorrhizal symbionts (*Castanea sativa* - European chestnut and *Pisolithus tinctorius*). *European Journal of Soil Biology* **45**, 275–282.
- Sena G, Jung JW, Benfey PN.** 2004. A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* **131**, 2817–2826.
- Serrazina S, Santos C, Machado H, Pesquita C, Vicentini R, Pais MS, Sebastiana M, Costa R.** 2015. *Castanea* root transcriptome in response to *Phytophthora cinnamomi* challenge. *Tree Genetics & Genomes* **11**, 1–19.
- Sherif S, El-Sharkawy I, Paliyath G, Jayasankar S.** 2012. Differential expression of peach ERF transcriptional activators in response to signaling molecules and inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Journal of Plant Physiology* **169**, 731–739.
- Shi JH, Yang ZB.** 2011. Is ABP1 an auxin receptor yet?. *Molecular plant* **4**, 635–640.
- Shpak ED, Berthiaume CT, Hill EJ, Torii KU.** 2004. Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* **131**, 1491–1501.
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T.** 1998. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant cell* **10**, 155–169.
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T.** 2001. Repressing a repressor gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 1555–1566.
- Sivanesan I, Jeong BR.** 2009. Induction and establishment of adventitious and hairy root cultures of *Plumbago zeylanica* L. **8**, 5294–5300.
- Skirvin RM.** 1981. Fruit crops. In: Conger BV. Eds. *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 51–139.
- Skoog F.** 1944. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *American Journal of Botany* **31**, 19–24.
- Skoog F, Miller CO.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. In vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**, 118–131.

- Smertenko A, Bozhkov PV.** 2014. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1343–1360.
- Sofi P, Wani S.** 2007. Prospects of nitrogen fixation in rice. 2007. *Asian Journal of Plant Sciences* **6**, 203–213.
- Solé A, Sánchez C, Vielba JM, Valladares S, Abarca D, Díaz-Sala C.** 2008. Characterization and expression of a *Pinus radiata* putative ortholog to the *Arabidopsis* *SHORT-ROOT* gene. *Tree Physiology* **28**, 1629–1639.
- Soler M, Serra O, Molinas M, García-Berthou E, Caritat A, Figueras M.** 2008. Seasonal variation in transcript abundance in cork tissue analyzed by real time RT-PCR. *Tree physiology* **28**, 743–751.
- Somleva MN, Schmidt EDL, De Vries SC.** 2000. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* **19**, 718–726.
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C.** 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require *ARGONAUTE1*. **17**, 1343–1359.
- Sriskandarajah S, Skirvin RM, Abu-Qaoud H.** 1990. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**, 185–189.
- Srivastava LM.** 2002. *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic press, San Diego.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W.** 2005. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant cell* **17**, 616–627.
- Staswick PE, Tiryaki I.** 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 2117–2127.
- Štefančič M, Štampar F, Osterc G.** 2005. Influence of IAA and IBA on root development and quality of *Prunus* ‘GiSela 5’ leafy cuttings. *HortScience* **40**, 2052–2055.
- Steffens B, Kovalev A, Gorb SN, Sauter M.** 2012. Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. *The Plant Cell* **24**, 3296–3306.
- Sterky F, Regan S, Karlsson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villar-roel R, Van Montagu M, Sandberg G, Olsson O, Teeri T, Boerjan W, gustafsson P, Uhlén M, Sundberg B, Lundeberg J.** 1998. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 13330–13335.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K.** 1958a. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* **45**, 705–708.
- Steward FC, Mapes MO, Smith J.** 1958b. Growth and organized development of cultured cells I. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany* **45**, 693–703.
- Stobrawa K.** 2014. Poplars (*Populus* spp.): Ecological role, applications and scientific perspectives in the 21<sup>st</sup> Century (Review paper). *Baltic Forestry* **20**, 204–213.
- Strader LC, Bartel B.** 2009. The *Arabidopsis* PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8 / ABCG36 ATP binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid. *The Plant Cell* **21**, 1992–2007.
- Stuurman J, Jäggi F, Kuhlemeier C.** 2002. Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & development* **16**, 2213–2218.
- Sukumar P, Maloney GS, Muday GK.** 2013. Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation. **162**, 1392–1405.



- Sun X, Jones WT, Rikkerink EHA.** 2012. GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochemical Journal* **442**, 1–12.
- Sun X, Xue B, Jones WT, Rikkerink E, Dunker AK, Uversky VN.** 2011. A functionally required unfoldome from the plant kingdom: intrinsically disordered N-terminal domains of GRAS proteins are involved in molecular recognition during plant development. *Plant Molecular Biology* **77**, 205–223.
- Suzuki S, Suzuki H.** 2014. Recent advances in forest tree biotechnology. *Plant Biotechnology* **31**, 1–9.
- Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JDG, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplace L, Bennett MJ.** 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**, 946–954.
- Swarup R, Péret B.** 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Frontiers in plant science* **3**, 1–11.
- Tacken E, Ireland H, Gunaseelan K, Karunairetnam S, Wang D, Schultz K, Bowen J, Atkinson RG, Johnston JW, Putterill J, Hellens RP, Schaffer RJ.** 2010. The role of ethylene and cold temperature in the regulation of the apple POLYGALACTURONASE1 gene and fruit softening. *Plant Physiology* **153**, 294–305.
- Tafazoli M, Nasr SMH, Jalilvand H, Bayat D.** 2013. Plant regeneration through indirect organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *African Journal of Biotechnology* **12**, 7063–7069.
- Tai FJ, Wang XL, Xu WL, Li XB.** 2008. Characterization and expression analysis of two cotton genes encoding putative UDP-Glycosyltransferases. *Molecular Biology* **42**, 44–51.
- Takahashi F, Sato-Nara K, Kobayashi K, Suzuki M, Suzuki H.** 2003. Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of plant research* **116**, 83–91.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Tasaka M, Kato T, Fukaki H.** 1999. The endodermis and shoot gravitropism. *Trends in plant science* **4**, 103–107.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K.** 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 847–859.
- Terranova R, Pereira CF, Du Roure C, Merkenschlager M, Fisher AG.** 2006. Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming. *Journal of cell science* **119**, 2065–2072.
- Tessadori F, Chupeau MC, Chupeau Y, Knip M, Germann S, van Driel R, Fransz P, Gaudin V.** 2007. Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* **120**, 1200–1208.
- Thibaud-Nissen F, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO.** 2003. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology* **132**, 118–136.
- Thomas P, Lee MM, Schiefelbein J.** 2003. Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (*Vitis vinifera* L.) stem cuttings. *Plant, Cell and Environment* **26**, 1497–1504.
- Thomas P, Schiefelbein J.** 2002. Cloning and characterization of an actin depolymerizing factor gene from grape (*Vitis vinifera* L.) expressed during rooting in stem cuttings. *Plant Science* **162**, 283–288.
- Thompson D.** 2014. Challenges for the large-scale propagation of forest trees by somatic embryogenesis - a review. In: Park YS and Bonga JM. Eds. *Proceedings of the Third International Conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Woody Plant Production Integrating Genetic and Vegetative Propagation Technologies.”* September 8–12, 2014. Vitoria-Gasteiz, Spain, 81–91.

- Thompson MR, Thorpe TA.** 1987. Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. In: Bonga JM, Durzan D. Eds. *Forestry Sciences. Cell and Tissue Culture in Forestry*. Springer Netherlands, 89–112.
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP.** 1991. Application of micropropagation to forestry. In: Debergh PC, Zimmerman RH. Eds. *Micropropagation*. Springer Netherlands, 311–336.
- Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M.** 2004. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **54**, 519–532.
- Tognetti VB, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, van de Cottea B, De Clercq I, Chiwochac S, Fenskec R, Prinsend E, Boerjan W, Gentye B, Stubbsf KA, Inzé D, Van Breusegema F.** 2010. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase *UGT74E2* modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *The Plant Cell* **22**, 2660–2679.
- Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Viéitez AM.** 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, 283–287.
- Trippi VS.** 1963. Studies on ontogeny and senility in plants. III. Changes in the proliferative capacity *in vitro* during ontogeny in *Robinia pseudoacacia* and *Castanea vulgaris* and in adult and juvenile clones of *R. pseudoacacia*. *Phyton (Int. J. exp. Bot.)* **20**, 153–159.
- Troch V, Sapeta H, Werbrouck S, Geelen D, Van Labeke MC.** 2010. *In vitro* culture of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) using temporary immersion bioreactors. *Acta Horticulturae* **885**, 383–390.
- Tromas A, Paponov I, Perrot-Rechenmann C.** 2010. Auxinbinding protein 1: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant Science* **15**, 436–446.
- Trupiano D, Yordanov Y, Regan S, Meilan R, Tschaplinski T, Scippa GS, Busov V.** 2013. Identification, characterization of an AP2/ERF transcription factor that promotes adventitious, lateral root formation in *Populus*. *Planta* **238**, 271–282.
- Tsai CJ, Podila GK, Chiang VL.** 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of quaking aspen (*Populus tremuloides*) and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* **14**, 94–97.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, dePamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D.** 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596–1604.
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ.** 2009. Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Current Biology* **19**, 1194–1199.
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ.** 2008. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology* **10**, 625–628.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, e115.



- Uribe M, Sandoval M, Méndez A, Mora F, Delaveau C.** 2011. *In vitro* rooting of *Beilschmiedia berteriana*, endemic to the south central area of Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* **38**, 107–115.
- Vaillant I, Paszkowski J.** 2007. Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 528–533.
- Valladares S, Rico S, Viéitez AM, Covelo P, Sánchez C.** 2013. Expression of the *QrCPE* gene is associated with the induction and development of oak somatic embryos. *Tree genetics & genomes* **9**, 1383–1393.
- Valledor L, Hasbún R, Meijón M, Rodríguez JL, Santamaría E, Viejo M, Berdasco M, Feito I, Fraga MF, Cañal MJ, Rodríguez R.** 2007. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **91**, 75–86.
- Valledor L, Meijón M, Hasbún R, Cañal MJ, Rodríguez R.** 2010. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *Journal of plant physiology* **167**, 351–357.
- Van Staden J, Harty AR.** 1988. Cytokinins and adventitious root formation. *Advances in plant sciences series (USA)* **2**, 185–201.
- Vandenbussche F, Petrášek J, Žádníková P, Hoyerová K, Pešek B, Raz V, Swarup R, Bennett M, Zažímalová E, Benková E, Van Der Straeten D.** 2010. The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development* **137**, 597–606.
- Vernoux T, Benfey PN.** 2005. Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**, 388–394.
- Viana AAB, Fragoso RR, Guimarães LM, Pontes N, Oliveira-Neto OB, Artico S, Nardeli SM, Alves-Ferreira M, Batista JAN, Silva MCM, Grossi-de-Sa MF.** 2011. Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 5'UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. *BioMed Central Biotechnology* **11**, 115.
- Vidal N.** 2002. Relación entre el contenido endógeno de reguladores de crecimiento, el estado ontogénico y la capacidad de enraizamiento de brotes de castaño y roble cultivados *in vitro*. Ph.D. Thesis, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
- Vidal N, Arellano G, San José MC, Viéitez AM, Ballester A.** 2003. Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiology* **23**, 1247–1254.
- Vidal N, Ballester A, Viéitez AM, Kevers C, Gaspar T.** 1994. Biochemical characteristic of chestnut shoots related to *in vitro* multiplication and rooting capacities. *Advances in Horticultural Science* **8**, 19–24.
- Vidal N, Blanco B, Cuenca B.** 2015. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **123**, 229–243.
- Vidal N, Viéitez AM, Fernández MR, Cuenca B.** 2008. Desarrollo de bancos de germoplasma de castaño y alcornoque mediante criopreservación de ápices caulinares y embriones somáticos. *Revista Real Academia Galega de Ciencias* **27**, 107–129.
- Vidal N, Viéitez AM, Fernández MR, Cuenca B, Ballester A.** 2010. Establishment of cryopreserved gene banks of European chestnut and cork oak. *European journal of forest research* **129**, 635–643.
- Vidoz ML, Loreti E, Mensuali A, Alpi A, Perata P.** 2010. Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal* **63**, 551–562.
- Viéitez AM, Corredoira E, Ballester A, Muñoz F, Durán J, Ibarra M.** 2009. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **98**, 135–145.
- Viéitez AM, González ML, Viéitez E.** 1978. *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill. *Scientia Horticulturae* **8**, 243–247.

- Viéitez AM, Pintos F, San José MC, Ballester A.** 1993. *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. Tree physiology **12**, 107–117.
- Viéitez AM, San José CM, Viéitez E.** 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. Journal of horticultural science **60**, 99–106.
- Viéitez AM, Sánchez MC, Amo-Marco JB, Ballester A.** 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. Plant cell, tissue and organ culture **37**, 287–295.
- Viéitez AM, Sánchez MC, García-Nimo ML, Ballester A.** 2007. Chapter 28 Protocol for micropropagation of *Castanea sativa*. In: Mohan Jain S, Häggman H. Eds. Protocols for micropropagation of wood trees and fruits. Springer Netherlands, 299–312.
- Viéitez AM, Sánchez MC, San José C.** 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. Scientia Horticulturae **41**, 151–159.
- Viéitez AM, Viéitez E.** 1980a. Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown *in vitro*. Physiologia Plantarum **50**, 127–130.
- Viéitez AM, Viéitez ML.** 1980b. Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. Journal of Horticultural Science **55**, 83–84.
- Viéitez AM, Viéitez ML.** 1983. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. Scientia Horticulturae **18**, 343–351.
- Viéitez AM, Viéitez ML, Viéitez E.** 1986. Forest and nut trees. 11. Chestnut (*Castanea spp.*). Biotechnology in agriculture and forestry **1**, 393–414.
- Viéitez AM, Viéitez ML, Ballester A.** 1981. *In vitro* chestnut regeneration: anatomical and chemical changes during the rooting process. Eds. Proceeding of the International Conference of the IUFRO on "In vitro Cultivation for Tree Species", Fontainebleau, France, 149–152.
- Viéitez E.** 1952. Ensayos de reproducción vegetativa de híbridos de castaño *Castanea sativa* x *Castanea crenata*. Anales de edafología y fisiología vegetal **11**, 185–210.
- Viéitez E.** 1960. Obtención de castaños resistentes a la enfermedad de la "tinta". Centro Regional de Enseñanzas, Investigaciones y Experiencias Forestales de Lourizán, Pontevedra, Spain, 29.
- Viéitez E.** 1974. Los tejidos mecánicos de las estaquillas como posibles reguladores de su capacidad de rizogénesis. Anales Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria. Serie Recursos Naturales **1**, 65–93.
- Viéitez FJ, San José MC, Ballester A, Viéitez AM.** 1990. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. Journal of plant physiology **136**, 253–256.
- Vielba JM, Díaz-Sala C, Ferro E, Rico S, Lamprecht M, Abarca D, Ballester A, Sánchez C.** 2011. *CsSCL1* is differentially regulated upon maturation in chestnut microshoots and is specifically expressed in rooting-competent cells. Tree physiology **31**, 1152–1160.
- Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J.** 2007. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. Trends in plant science **12**, 160–168.
- Vijaybhaskar V, Subbiah V, Kaur J, Vijayakumari P, Siddiqi I.** 2008. Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. **33**, 185–193.
- Visser EJW, Cohen JD, Barendse GWM, Blom CWPM, Voesenek LACJ.** 1996. An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. Plant physiology **112**, 1687–1692.
- Wang X.** 2009. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. FEBS Letters **583**, 3303–3309.

- Wang J, Andersson-Gunnerås S, Gaboreanu I, Hertzberg M, Tucker MR, Zheng B, Leśniewska J, Mellerowicz EJ, Laux T, Sandberg G, Jones B.** 2011. Reduced expression of the *SHORT-ROOT* gene increases the rates of growth and development in hybrid poplar and *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **6**, e28878.
- Wang F, Ning D, Chen Y, Dang C, Han NS, Liu Y, Ye GY.** 2015. Comparing gene expression profiles between Bt and non-Bt rice in response to brown planthopper infestation. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1181.
- Wang D, Pei K, Fu Y, Sun Z, Li S, Liu H, Tang K, Han B, Tao Y.** 2007. Genome-wide analysis of the *auxin response factors (ARF)* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **394**, 13–24.
- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY.** 2005. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 2204–2216.
- Webster CA, Jones OP.** 1989. Micropropagation of the apple rootstock. M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. *Journal of horticultural science* **64**, 421–428.
- Weis M, Lim EK, Bruce NC, Bowles DJ.** 2008. Engineering and kinetic characterisation of two glucosyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie* **90**, 830–834.
- Wen ZZ, Lin Y, Liu YQ, Wang M, Wang YQ, Liu W.** 2013. Effects of paclobutrazol *in vitro* on transplanting efficiency and root tip development of *Dendrobium nobile*. *Biologia Plantarum* **57**, 576–580.
- Wendling I, Trueman SJ, Xavier A.** 2014. Maturation and related aspects in clonal forestry—Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forests* **45**, 449–471.
- Westfall CS, Herrmann J, Chen Q, Wang S, Jez JM.** 2010. Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases. *Plant signaling & behavior* **5**, 1607–1612.
- Westfall CS, Zubieta C, Herrmann J, Kapp U, Nanao MH, Jez JM.** 2012. Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Science* **336**, 1708–1711.
- Wheeler N, Sederoff R.** 2009. Role of genomics in the potential restoration of the American chestnut. *Tree Genetics & Genomes* **5**, 181–187.
- White PR.** 1939. Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **66**, 507–513.
- Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW.** 2005. NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *The Plant Journal* **43**, 118–130.
- Williams EG, Maheswaran G.** 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* **57**, 443–462.
- Wiśniewska A, Pietraszewska-Bogiel A, Zuzga S, Tagashira N, Łotocka B, Malepszy S, Filipecki M.** 2013. Molecular characterization of *SCARECROW (CsSCR)* gene expressed during somatic embryo development and in root of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 1483–1495.
- Woo HH, Hackett WP, Das A.** 1994. Differential expression of a chlorophyll a/b binding protein gene and a proline rich protein gene in juvenile and mature phase English ivy (*Hedera helix*). *Physiologia Plantarum* **92**, 69–78.
- Woo HH, Jeong BR, Koo KB, Choi JW, Hirsch AM, Hawes MC.** 2007. Modifying expression of closely related UDP-glycosyltransferases from pea and *Arabidopsis* results in altered root development and function. *Physiologia Plantarum* **130**, 250–260.
- Woodward AW, Bartel B.** 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707–735.
- Wu RL.** 1998. Genetic mapping of QTLs affecting tree growth and architecture in *Populus*: implication for ideotype breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 447–457.

- Wu C, Dickstein R, Cary AJ, Norris JH.** 1996. The auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl)phthalamic acid elicits pseudonodules on nonnodulating mutants of white sweetclover. *Plant Physiology* **110**, 501–510.
- Wu Y, Xun Q, Guo Y, Zhang J, Cheng K, Shi T, He K, Hou S, Gou X, Li J.** 2015. Genome-wide expression pattern analyses of the *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Molecular plant* **9**, 289–300.
- Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN.** 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* **127**, 595–603.
- Xing Z, Satchwell MF, Powell WA, Maynard CA.** 1997. Micropropagation of american chestnut : increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **33**, 43–49.
- Xu ZS, Chen M, Li LC, Ma YZ.** 2011. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**, 570–585.
- Xu T, Dai N, Chen J, Nagawa S, Cao M, Li H, Zhou Z, Chen X, De Rycke R, Rakusová H, Wang W, Jones AM, Friml J, Patterson SE, Bleeker AB, Yang Z.** 2014. Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling. *Science* **343**, 1025–1028.
- Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, Scheres B.** 2006. A molecular framework for plant regeneration. *Science* **311**, 385–388.
- Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen JG, Wu MJ, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones AM, Yang Z.** 2010. Cell surface-and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 99–110.
- Xu M, Zhu L, Shou H, Wu P.** 2005. A *PIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant & cell physiology* **46**, 1674–1681.
- Xuan L, Xu M, Chen C, Yang C, Xu L, Huang M.** 2014. Identification and characterization of three *PeSHRs* and one *PeSCR* involved in adventitious root development of *Populus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **117**, 253–264.
- Xuan W, Zhu FY, Xu S, Huang BK, Ling TF, Qi JY, Ye MB, Shen WB.** 2008. The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process. *Plant Physiology* **148**, 881–893.
- Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN.** 2010. PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et biophysica Acta -Proteins and proteomics* **1804**, 996–1010.
- Yadav S, David A, Bhatla SC.** 2010. Nitric oxide modulates specific steps of auxin-induced adventitious rooting in sunflower. *Plant signaling & behavior* **5**, 1163–1166.
- Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A.** 2003. Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 49102–49112.
- Yan Z, Hossain MS, Arikat S, Valdés-López O, Zhai J, Wang J, Libault M, Ji T, Qiu L, Meyers BC, Stacey G.** 2015. Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytologist* **207**, 748–759.
- Yang WC, Katinakis P, Hendriks P, Smolders A, de Vries F, Spee J, van Kammen A, Bisseling T, Franssen H.** 1993. Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *The Plant Journal* **3**, 573–585.
- Yang F, Song Y, Yang H, Liu Z, Zhu G, Yang Y.** 2014. An auxin-responsive endogenous peptide regulates root development in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**, 635–647.



- Yelenosky G, Vu CVJ, Bausher MG.** 1993. Paclobutrazol-induced dwarfing of "valencia" orange trees. *Proceedings of the Florida state Horticultural Society* **106**, 329–332.
- Yevtushenko DP, Misra S.** 2010. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial hybrid poplar *Populus nigra* L. x *P. maximowiczii* A. Henry. *Plant Cell Reports* **29**, 211–221.
- Yin XR, Allan AC, Chen KS, Ferguson IB.** 2010. Kiwifruit *EIL* and *ERF* genes involved in regulating fruit ripening. *Plant Physiology* **153**, 1280–1292.
- Yonekura-Sakakibara K, Hanada K.** 2011. An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *The Plant Journal* **66**, 182–193.
- Yu NI, Lee SA, Lee MH, Heo JO, Chang KS, Lim J.** 2010. Characterization of SHORT-ROOT function in the *Arabidopsis* root vascular system. *Molecules and cells* **30**, 113–119.
- Zalesny RS Jr, Zalesny JA.** 2009. Selecting *Populus* with different adventitious root types for environmental benefits, fiber, and energy. In: Niemi K, Scagel C. Eds. *Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants-from genes to applications*. Research Singpost, Kerala, 359–384.
- Zan Y, Ji Y, Zhang Y, Yang S, Song Y, Wang J.** 2013. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of *Populus* leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BioMed Central genomics* **14**, 318.
- Zažímalová E, Murphy AS, Yang H, Hoyerova K, Hošek P.** 2010. Auxin Transporters — Why So Many ?. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001552.
- Zhang B, Oakes AD, Newhouse AE, Baier KM, Maynard CA, Powell WA.** 2013. A threshold level of oxalate oxidase transgene expression reduces *Cryphonectria parasitica*-induced necrosis in a transgenic American chestnut (*Castanea dentata*) leaf bioassay. *Transgenic research* **22**, 973–982.
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y.** 2009. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of experimental botany* **60**, 3781–3796.
- Zhang Z, Li Q, Li Z, Staswick PE, Wang M, Zhu Y, He Z.** 2007. Dual regulation role of *GH3.5* in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant physiology* **145**, 450–464.
- Zheng X, Miller ND, Lewis DR, Christians MJ, Lee KH, Muday GK, Spalding EP, Vierstra RD.** 2011. AUXIN UP-REGULATED F-BOX PROTEIN1 regulates the cross talk between auxin transport and cytokinin signaling during plant root growth. *Plant Physiology* **156**, 1878–1893.
- Zhou D, Yin K, Xu Z, Xue H.** 2003. Effect of polar auxin transport on rice root development. *Acta Botanica Sinica* **45**, 1421–1427.
- Zhu XY, Chai SJ, Chen LP, Zhang MF, Yu JQ.** 2010. Induction and origin of adventitious roots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **101**, 287–294.
- Žiauka J, Kuusiene S.** 2010. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during *in vitro* culture of aspen (*Populus tremula* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **102**, 221–228.